

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE COMPARÉE DES HYPERÉOSINOPHILIES EN FONCTION DE LEUR ÉTIOLOGIE

par R. DESCHIENS (*)

(Institut Pasteur, Service de Parasitologie)

Définitions.

Le problème de l'origine, de la nature et de l'interprétation de l'éosinophilie demeure, malgré le nombre important des travaux que cette question a suscité, parmi les plus obscurs de l'hématologie.

L'hyperéosinophilie est fréquente dans les états nosologiques au cours desquels s'établissent des conflits antigène-anticorps (helminthiases, infections éosinophilogènes); elle est notée communément dans les processus toxiques et irritatifs comportant la libération ou la désintégration, dans l'organisme, de molécules protidiques hétérogènes ou endogènes (intoxications, asthme, dermatoses, résorption d'épanchements, radiothérapie). Ces constatations ont suscité l'hypothèse pathogénique assez solidement étayée, mais non encore démontrée, que la cellule éosinophile serait le substratum de certaines réactions humérales antigéniques, d'intolérance et d'hypertonie vagale (Weinberg et Seguin, 1913; H. Jausion, Hugonot et Sohier, 1925 [1], L. Derobert [2]), et on a supposé que la granulation éosinophile est un complexe protido-lipidique instable, ayant pour origine la floculation puis la cristallisation d'éléments protidiques hétérogènes ou endogènes, insolubles, ou adultérés dans l'économie.

(*) Manuscrit reçu le 23 mars 1955.

Sur le plan pragmatique, l'hyperéosinophilie sanguine, chez l'homme, est un état pathologique dans lequel le nombre des cellules à granulations éosinophiles est notablement augmenté et dépasse le maximum de fréquence de 0,5 à 4 p. 100 (200 à 300 éosinophiles par millimètre cube de sang) que l'on observe chez un sujet normal (1).

L'hyperéosinophilie médullaire contrôlable au niveau des moelles sternales ou épiphysaires est contemporaine de l'éosinophilie sanguine, puisque celle-ci est le témoin d'une réaction granulocytopoïétique de la moelle osseuse.

L'hyperéosinophilie tissulaire correspond à l'apparition, dans des organisations cellulaires qui ne contiennent normalement que quelques cellules éosinophiles, de nombreux histiocytes ou polynucléaires éosinophiles. Ce processus paraît indicatif, sans préjuger de l'origine histologique des cellules éosinophiles observées, d'un remaniement irritatif et inflammatoire local, subaigu, de nature toxique (endogène ou hétérogène) ou parasitaire.

En restant dans les limites des faits d'observation ou d'expérimentation, on constate que l'hyperéosinophilie apparaît dans des états pathologiques dont l'étiologie est disposée sur un très large éventail.

On est, ainsi, amené à distinguer : 1° les éosinophilies secondaires à des états nosologiques divers, ce sont les plus communes (parasitoses, infections, intoxications, allergie); 2° les éosinophilies dites cryptogénétiques, non leucémiques, affections relativement rares, dont l'une des expressions cliniques est l'éosinophilie familiale; 3° les leucémies à éosinophiles, généralement aiguës ou subaiguës, qui sont exceptionnelles.

A ces groupes représentatifs des éosinophilies cliniques, humaines ou animales, il faut joindre celui des éosinophilies expérimentales dont le type est l'éosinophilie du cobaye provoquée par les extraits de douves (*Fasciola hepatica*) et par les extraits de piment de Guinée (*Capsicum annuum*).

Les éosinophilies secondaires ont des étiologies multiples; on peut distinguer les suivantes :

1° Les hyperéosinophilies des parasitoses (helminthiases) qui sont, comme nous l'avons dit, les plus communes, dont le taux, relativement élevé (10 à 90 p. 100), est fonction de l'espèce parasite (filariose, bilharziose, anguillulose, ankylostomose), du degré de l'infestation et des aptitudes réactionnelles de l'hôte; l'évolution de ces éosinophilies en fonction du temps comporte

(1) Le nombre et le taux des éosinophiles dans le sang, chez un même sujet normal peut varier de 0,5 à 3 p. 100; il s'élève pendant la période digestive (Hirschfeld, 1923) et diminue à l'occasion du travail musculaire (Goldberg, 1927).

une période de latence, une période d'ascension et une période de chute (G. Lavier [3]).

2° Les hyperéosinophilies des affections cutanées qui offrent des taux généralement peu élevés (5 à 10 p. 100) ; elles sont générales ou locales et s'observent, surtout chez l'homme, dans les dermatoses bulleuses (maladie de Duhring), dans les éruptions et les érythrodermies post-médicamenteuses, dans la gale, surtout la gale norvégienne (Flye Sainte-Marie, 1924).

3° Les hyperéosinophilies des maladies infectieuses qui apparaissent au décours de la maladie, c'est-à-dire à la fin de la période fébrile. Ces éosinophilies de convalescence sont modérées (5 à 10 p. 100). Il y a, dans la règle, discordance entre la fièvre et l'éosinophilie (éosinophilie expérimentale du cobaye) ; la scarlatine et, parfois, la variole font exception à la règle ; dans la scarlatine, l'éosinophilie apparaît dès le début de l'infection mais augmente notablement au début de la convalescence.

4° Les hyperéosinophilies des intoxications exogènes et endogènes et des diathèses ; éosinophilies modérées et inconstantes notées, en particulier, dans l'intoxication par le benzol et par les sels d'or, et, d'autre part, dans la diathèse rhumatismale et dans l'asthme. Les éosinophilies consécutives aux irradiations (rayons X, radium) [Aubertin, 1911].

5° Les hyperéosinophilies d'origine thérapeutique ; éosinophilies consécutives au traitement par la streptomycine, par les extraits de foie, par le radium ; elles sont habituellement modérées.

6° Les hyperéosinophilies des états allergiques (groupe confus destiné à être dissout, et dans lesquelles semblent intervenir, outre des allergènes de sensibilisation *stricto sensu* (pollens, éléments particuliers), des étiologies diathésiques et dystrophiques (asthme, syndrome de Loeffler, éosinophilie tropicale).

7° Les hyperéosinophilies des maladies du sang qui, en dehors de la leucémie maligne à éosinophiles, s'observent dans la maladie de Hodgkin (taux des éosinophiles : 5 à 10 p. 100), la leucémie myéloïde banale, les séquelles de splénectomie.

Enfin, le syndrome d'hyperéosinophilie a été signalé dans les pleurésies séro-hématiques, dans l'anoxémie par insuffisance cardiaque dans les tumeurs conjonctives ou épithéliales (éosinophilie locale, médullaire ou sanguine), dans les granulomes éosinophiles de la peau de l'homme et du chat (J. Guilhaon, P. de Graciansky et A. Paraf [4]).

Hyperéosinophilies parasitaires.

Dans le groupe vaste et encore complexe des hyperéosinophilies secondaires, nous pensons que l'on peut séparer, en raison de

leurs caractères relativement homogènes, les hyperéosinophilies des parasitoses.

Les hyperéosinophilies des parasitoses s'observent, presque exclusivement, dans les helminthiases viscérales et intestinales et, parfois, dans les acariases [gale, acariases pulmonaires] (2). Les infestations les plus éosinophilogènes sont les parasitoses viscérales et, en particulier, les filarioses, les bilharzioses, les distomatoses ; les infestations intestinales provoquent, dans la règle, une éosinophilie beaucoup plus modérée, sauf dans les régions tropicales.

Les hyperéosinophilies parasitaires offrent un certain nombre de caractères définitifs et évolutifs, qui permettent de les rassembler et de les confronter aux autres éosinophilies secondaires, en fonction de leur étiologie ; ce sont :

1° La fréquence et, pratiquement, la constance de l'hyperéosinophilie sanguine, dans les helminthiases, à des taux, d'ailleurs variables avec l'espèce parasite, avec la densité parasitaire et avec l'aptitude réactionnelle de l'hôte ;

2° Les caractères de la courbe de l'éosinophilie, son évolution, en fonction du temps ;

3° La résistance des hyperéosinophilies parasitaires aux facteurs d'éosinopénie et, en particulier, à l'hormone hypophysaire corticotrope et à la cortisone.

I. — FRÉQUENCE ET INTENSITÉ DE L'ÉOSINOPHILIE DANS LES HYPERÉOSINOPHILIES PARASITAIRES.

La *quasi constance* de l'éosinophilie dans les infestations parasitaires à helminthes est une règle que l'observation et que l'expérimentation vérifient. Sans doute, l'éosinophilie peut-elle être faible (10 à 20 p. 100), en fonction de la nature de l'infestation parasitaire (dans le téniasis, par exemple), et de l'évolution récente (taux progressif de la période d'invasion) ou ancienne (taux dégressif des vieilles parasitoses) de l'infestation, mais elle est pratiquement constante et ce comportement réactionnel tend à distinguer les éosinophilies parasitaires des éosinophilies secondaires non parasitaires, dont l'apparition est irrégulière par rapport à la circonstance éosinophilogène.

Sur le plan expérimental, le caractère quasi constant de l'éosinophilie parasitaire et l'irrégularité d'apparition des éosinophilies

(2) Les maladies parasitaires éosinophilogènes se rattachent, pratiquement toutes, à des infestations par les helminthes et, parfois, par des acariens (gale, acariase des voies respiratoires) ou des champignons. Les infestations à protozoaires, et particulièrement, l'amibiase, ne suscitent pas d'hyperéosinophilie.

à étiologie non parasitaire se vérifie. R. Deschiens et M. Poirier (1953) [5] ont montré que, chez le cobaye, on peut obtenir une hyperéosinophilie sanguine (taux 10 à 19 p. 100) et médullaire (taux 20 à 25 p. 100), dans près de 100 p. 100 des cas, en injectant tous les deux jours, par la voie intramusculaire, pendant une période de dix à vingt jours, une dose de 1 ml (équivalence à 1 g de ver frais par millilitre) d'un extrait aqueux de *Fasciola hepatica*. Au contraire, chez le cobaye, R. Deschiens et M. Poirier [6] n'ont obtenu des hyperéosinophilies sanguines et médullaires, avec des extraits aqueux de piment de Guinée et avec l'extrait de tabac, que dans 25 à 30 p. 100 des cas. Enfin, R. Deschiens et E. Lambault (1954) [7], avec la streptomycine (30 mg par kilogramme de poids tous les deux jours, pendant quinze à vingt jours), chez le cobaye, notent l'apparition de l'hyperéosinophilie chez 30 p. 100, seulement, des animaux éprouvés.

Les facteurs qui conditionnent l'ordre de grandeur de l'éosinophilie, son taux, son évolution, ses points critiques (début de réaction hématologique, acmé, régression) ont été précisés par G. Lavier [8].

Les espèces parasites sont plus ou moins éosinophilogènes. C'est ainsi que les filaires, les douves, les schistosomes conduisent, toutes choses égales d'ailleurs, à des taux élevés d'éosinophilie pouvant atteindre 80 p. 100, alors que les ténias et les oxyures ne réalisent que des taux modestes d'éosinophilie situés entre 5 p. 100 et 20 p. 100. L'espèce parasite est donc un facteur de l'ordre de grandeur de l'éosinophilie. L'espèce intervient encore pour situer chronologiquement ce que G. Lavier appelle, de façon heureuse, « les points critiques » de l'éosinophilie, c'est-à-dire la date d'apparition du phénomène, la date de son acmé et celle de sa régression et de sa disparition.

L'aptitude éosinophilogène des espèces parasites est, elle-même, en relation avec la libération dans les tissus de l'hôte de produits toxiques éosinophilogènes qui peuvent être extraits et isolés et dont le pouvoir éosinophilogène peut être testé expérimentalement, chez le cobaye, par exemple (R. Deschiens et M. Poirier, 1952 [9]).

La localisation viscérale des vers, chez l'hôte, a son incidence sur l'éosinophilie. Les vers situés dans l'intimité des tissus semblent diffuser dans l'organisme une plus grande quantité de substances toxiques et éosinophilogènes que les helminthes du tube digestif ou des cavités naturelles. Les helminthes enkystés, soit spontanément, soit par un processus tissulaire réactionnel (cysticercose, hydatidose), sont moins éosinophilogènes que les parasites libres (filarioses, schistosomoses).

L'intensité du parasitisme, correspondant à la densité parasitaire, a son incidence sur le taux de l'éosinophilie ; cette relation est commandée, pour partie, par la diffusion de quantités de

substances toxiques et éosinophilogènes proportionnelles au nombre d'helminthes infestant l'organisme. Le phénomène, cependant, est complexe ; ainsi que l'a montré Lavier, il semble que, dans certaines infestations, dans l'ascaridiose et dans la distomatose à *Clonorchis sinensis*, par exemple, il y ait un seuil à partir duquel apparaît l'hyperéosinophilie ; le seuil dépassé, le nombre des parasites intervient pour établir le maximum du taux de l'éosinophilie, suivant une courbe complexe d'abord ascendante, jusqu'à atteindre une acmé pour redescendre, ensuite, plus ou moins rapidement.

L'aptitude réactionnelle de l'hôte a une influence évidente sur le taux de l'éosinophilie ; elle interfère, dans une certaine mesure, avec la nature allergique du terrain, mais ne se confond pas avec elle ; l'intégrité ou l'insuffisance des fonctions antitoxiques immunes et glandulaires (glandes endocrines, surrénale) sont des facteurs qui interviennent probablement (R. Deschiens, M. Poirier et L. Lamy, *loc. cit.*).

Des influences extrinsèques peuvent modifier l'aptitude réactionnelle de l'hôte, telles les infections bactériennes ou virales, en suscitant un état fébrile, entraînant, généralement, une réduction ou une disparition transitoire de l'éosinophilie sanguine. Les accidents, d'origine anaphylactique, ou toxique (rupture d'un kyste hydatique, lyse thérapeutique de filaires), peuvent, au contraire, renforcer, de façon épisodique, une hyperéosinophilie.

II. — COURBE ÉVOLUTIVE DE L'ÉOSINOPHILIE PARASITAIRE.

Nous devons à G. Lavier (*loc. cit.*) la notion du caractère rigoureusement constant de l'évolution des hyperéosinophilies parasitaires dans le temps.

La courbe, qui traduit l'incidence du facteur chronologique sur les hyperéosinophilies parasitaires, a toujours la même forme générale quelle que soit l'espèce parasitaire en cause. On y distingue trois périodes :

1° Une période de latence qui correspond à la pénétration et à l'adaptation du parasite chez l'hôte ; 2° une période d'ascension, d'abord relativement rapide, puis plus lente, atteignant un maximum qui peut se maintenir suivant une disposition en plateau pendant un certain temps ; 3° une période de chute, d'abord assez rapide, puis lente, avec une courbe qui tend à devenir parallèle à l'axe des temps. La dernière image évolutive de la courbe traduit la stabilisation relative du taux des éosinophiles à un chiffre toujours faible, par rapport au maximum précédemment atteint ; elle peut s'interpréter comme un état d'équilibre, biologique et humoral, entre deux antagonistes, le parasite et l'hôte.

Les réinfections, sur un sujet prémuni, provoquent l'apparition

d'une nouvelle courbe d'éosinophilie comparable à celle de la première infection mais avec un taux maximum toujours plus faible que dans celle-ci, comme si une accoutumance s'était établie (G. Lavier). Une thérapeutique anthelminthique active détermine une exacerbation transitoire de l'éosinophilie puis une chute plus rapide que la normale.

Les variations de l'aptitude réactionnelle de l'hôte et, en particulier, les infections intercurrentes, les incidents allergiques, toxiques, anaphylactiques, glandulaires qui, pour partie, la commandent, ont leur incidence, d'ailleurs épisodique, sur la courbe, soit dans le sens d'un abaissement, soit dans le sens du relèvement, du taux des éosinophiles.

Nous avons déjà indiqué que l'espèce parasitaire fixe, dans une certaine mesure, les « points critiques » de la courbe de l'éosinophilie et, par conséquent sa période, qui peut être regardée comme spécifique.

La disparition de l'hyperéosinophilie se fait après un temps variable, suivant l'espèce parasitaire, le plus souvent à l'occasion de la guérison thérapeutique par un anthelminthique ou lorsque le parasite meurt spontanément, ou, encore, lorsqu'il subit un enkystement réactionnel. L'annulation de la courbe peut se faire avant la disparition du parasite si celui-ci vit longtemps.

III. — RÉSISTANCE DES HYPERÉOSINOPHILIES PARASITAIRES AUX ACTIONS HORMONALES ÉOSINOPÉNIQUES.

La fréquence de l'irréductibilité des hyperéosinophilies parasitaires, lorsqu'elles sont soumises à des épreuves hormonales, entraînant, chez des sujets normaux, une réduction du nombre et du taux des éosinophiles, est un caractère qui les distingue dans une assez large mesure des hyperéosinophilies d'étiologie non parasitaire.

Les épreuves hormonales utilisées dans l'étude de l'irréductibilité ou de la labilité des éosinophilies emploient, classiquement, l'ACTH (hormone hypophysaire corticotrope) ou la cortisone (hormone cortico-surrénale), en injection intramusculaire, en perfusions ou *per os*.

En ce qui concerne les épreuves par l'ACTH, l'examen analytique des travaux de H. Galliard, J. Lapiere, R. Berdonneau et M. Larivière (1953) [10, 11], chez l'homme — sur la prospection des hyperéosinophilies parasitaires par le test de Thorn (3), à

(3) On sait que, d'après Thorn, l'injection de 25 mg provoque une réduction des éosinophiles de plus de 50 p. 100 (lecture quatre heures après l'injection), en cas d'intégrité fonctionnelle du cortex surrénal (test de Thorn positif) et une irréductibilité (test négatif) dans le cas contraire.

l'ACTH —, fait apparaître que, dans 24 cas de parasitisme par des helminthes divers, dont 12 cas de filariose à *Loa loa*, 15 sujets (62,25 p. 100) montraient une éosinophilie irréductible et 7 (37,75 p. 100) une éosinophilie labile. D'autre part, H. Galliard et R. Berdonneau (1953) [12], dans la strongyloïdose expérimentale du chien, chez 5 animaux, notent l'irréductibilité de l'éosinophilie dans tous les cas d'infestation, et sa labilité chez les chiens guéris.

R. Deschiens et H. Floch (1954) [13], en appliquant le test de Thorn à l'ACTH chez 25 enfants antillais de 5 à 14 ans, atteints d'hyperéosinophilies parasitaires d'origine filarienne, ascaridienne et ankylostomienne, notent que l'irréductibilité de l'éosinophilie est beaucoup plus fréquente (92 p. 100 des cas) que la labilité [8 p. 100 des cas] (4).

Les constatations de Koerber, au Sénégal (1954) [14], chez l'adulte, conduisent à des résultats qui corroborent les données déjà exposées. En outre, E. Montestruc et R. Berdonneau (1954) [15], à la Martinique, chez 21 sujets atteints de bilharziose intestinale, d'ankylostomose ou d'ascaridiose, présentant une éosinophilie parasitaire massive (taux des éosinophiles supérieur à 25 p. 100), notent, avec l'ACTH (25 mg en injection intramusculaire), l'irréductibilité (test de Thorn négatif) de l'éosinophilie dans 76 p. 100 des cas et la labilité de l'éosinophilie dans 24 p. 100 des cas.

Le test à l'ACTH, préconisé par H. Galliard, qui comporte une injection unique, est pratique et rapide; il convient particulièrement à la prospection des collectivités.

Les auteurs, qui ont prospecté, avec la cortisone, les hyperéosinophilies parasitaires, se sont plutôt orientés vers l'emploi de techniques utilisant des doses réfractées d'hormones que vers un test à épreuve unique. En effet, si l'ACTH, ainsi que le soulignent H. Galliard et ses collaborateurs, fait intervenir un cycle hormonal complet, en suscitant une action de l'hormone hypophysaire corticotrope sur la surrénale, l'administration de la cortisone a, au contraire, une action substitutive qui doit être prolongée. D'autre part, l'emploi d'actions hormonales successives et étalées dans le temps, pour prospecter une hyperéosinophilie, correspond bien au caractère et à l'évolution de cette réaction hématologique qui ne s'établit, n'évolue et ne rétrocede que lentement.

R. Deschiens et J. Mauzé (1953) [16], ainsi que R. Deschiens et

(4) Il y a lieu de remarquer que la posologie d'ACTH, utilisée par les auteurs pour des raisons de prudence, est une dose relativement faible, eu égard à la résistance des éosinophilies de l'enfance aux actions hormonales.

L. Lamy (1953) proposent un test comportant l'administration de cinq à sept injections intramusculaires de cortisone, à la dose de 100 mg par injection, les injections étant faites à quarante-huit heures d'intervalle, pour atteindre une dose totale de 500 à 700 mg.

L'application de cette épreuve, dans la prospection des hyperéosinophilies parasitaires, conduit aux constatations suivantes :

Chez 11 sujets africains, porteurs d'ascaris et d'ankylostomes, présentant 1 426 à 7 198 éosinophiles par centimètre cube de sang et un taux d'éosinophilie de 23 à 61 p. 100 (moyenne de 5 examens), R. Deschiens, L. Lamy et J. Estival (1953) [47] notent une irréductibilité ou une réductibilité de l'éosinophilie inférieure à 20 p. 100, dans 91 p. 100 des cas (10 cas sur 11), et une labilité (réductibilité de 50 p. 100) de l'éosinophilie dans 9 p. 100 des cas (1 cas sur 11).

Chez 2 sujets antillais atteints, l'un d'anguillulose, l'autre d'ascaridiose et offrant des taux d'éosinophilie de 30 p. 100 et de 32 p. 100, Deschiens et Mauzé (1952) [*loc. cit.*] constatent l'irréductibilité de l'éosinophilie. Chez 2 jeunes sujets européens présentant, l'un, une filariose à *Loa loa*, l'autre, une infestation à *W. bancrofti*, R. Degos, J. Delort et R. Deschiens (1954) observent une irréductibilité de l'hyperéosinophilie.

P. Mollaret [48], dans 4 cas de trichinose humaine, offrant des taux d'éosinophilie de 14 p. 100 à 50 p. 100, n'a obtenu, en utilisant une posologie de cortisone de 100 mg par jour, pendant sept jours (injections intramusculaires), la labilité de l'éosinophilie que chez 1 malade ; les 3 autres ayant montré une éosinophilie irréductible.

En ce qui concerne l'utilisation de la cortisone *per os*, nous pouvons encore relater 1 cas de filariose et 1 cas d'anguillulose chez des Européens, dans lesquels un traitement par la cortisone (200 mg par jour, pendant dix jours) n'a pas permis d'obtenir une réduction de l'éosinophilie.

Cependant, H. Galliard, J. Lapierre, M. Larivière et R. Berdonneau (1953) [*loc. cit.*], traitant 3 malades par l'administration de 100 mg de cortisone, pendant deux jours, traitement habituellement suffisant pour provoquer l'éosinopénie chez un sujet normal, notent la réductibilité de l'éosinophilie dans deux cas et l'irréductibilité dans un cas. Ces auteurs indiquent que la chute des éosinophiles, obtenue chez leurs malades, ne se montra que transitoire et que le chiffre initial se rétablit en quatre jours, ce qui confirme la résistance et le caractère rebelle des hyperéosinophilies parasitaires.

Sur le plan expérimental, R. Deschiens, M. Poirier et L. Lamy (1953) [*loc. cit.*] ont montré que, dans 5 cas d'hyperéosinophilies obtenues chez le cobaye, par l'injection d'extrait de *Fasciola*

hepatica, l'éosinophilie n'était pas réductible par le traitement (injections intramusculaires) par la cortisone appliqué pendant sept à quinze jours (dose totale : 5,9 à 11 mg par kilogramme). Ces mêmes auteurs, dans 3 cas d'hyperéosinophilies chez des chats infestés par *Toxocara felis*, n'ont pu obtenir, avec le même traitement, l'éosinopénie ; néanmoins, dans 2 cas de téniasis à *Dipylidium caninum* du chat, ils ont noté la réductibilité de l'éosinophilie (réduction de 40 p. 100) dans un cas, et l'irréductibilité dans l'autre.

Les hyperéosinophilies du téniasis et de l'oxyurose qui donnent des taux, d'ailleurs, peu élevés semblent plus labiles que les autres éosinophilies des helminthiases. C'est ainsi que Deschiens (1955) et Koerber (1955) ont observé, dans 3 cas de téniasis à *T. saginata*, des hyperéosinophilies de 12 à 18 p. 100 qui se montrèrent réductibles par l'ACTH (test de Thorn).

Si, maintenant, on reprend le bilan des résultats obtenus par les auteurs ayant fait fortuitement des traitements ou des épreuves par la cortisone et par l'ACTH, dans les infestations parasitaires éosinophilogènes [F. Delbarre (1950) [19], dans un cas de filariose à *Loa loa*, testé par l'ACTH ; Luongo, Reid et Weiss [20], dans un cas de trichinose traité par l'ACTH ; Davis et Most (1951) [21], dans 3 cas de trichinose traités par l'ACTH ; Warter et Moïse (1953) [22], dans 2 cas de filariose à *Loa loa* et à *D. perstans* traités par l'ACTH], on constate que ces auteurs ont relevé 7 cas d'irréductibilité et 5 cas de labilité de l'éosinophilie sanguine. Il convient, d'ailleurs, de remarquer que, malgré l'intérêt des douze dernières données précitées, elles correspondent, en général, à des sondages faits à l'occasion de traitements avec des doses élevées d'hormones.

L'attention doit, enfin, être appelée sur un ensemble de faits recueillis par A. Telkka, S. Wahlstrom et R. Koulumies (1953) [23], relatifs à l'action de l'ACTH et de l'adrénaline (test de Thorn), dans 33 cas d'hyperéosinophilies liées à une botriocéphalose. Chez les sujets présentant une anémie botriocéphalique et, par conséquent, les plus infestés, l'éosinophilie se montra irréductible ; les autres malades révélèrent une éosinophilie réductible. On sait que, dans le téniasis, l'hyperéosinophilie est discrète, au moins dans les régions tempérées ; aussi, la réductibilité de l'éosinophilie dans les cas légers ou bénins de botriocéphalose paraît-elle pertinente, car il ne semble pas y avoir des différences essentielles entre les éosinophilies mais des agents éosinophilogènes plus ou moins puissants dans leurs effets.

Dans le cadre des hyperéosinophilies parasitaires et de leur interrogation par l'ACTH (test de Thorn), Deschiens et Litalien [24] ont confronté le comportement des hyperéosinophilies

à taux modéré, situé au-dessous de 20 p. 100, et celui des hyperéosinophilies profondes à taux supérieur à 30 p. 100.

Dans le premier groupe (taux inférieur à 20 p. 100), ils ont montré, chez 10 malades (3 cas de téniasis à *T. saginata*, 3 cas d'ascaridiose, 1 cas de schistosomiase à *S. mansoni*), que l'hyperéosinophilie était réductible par 25 mg d'ACTH dans 7 cas (70 p. 100).

Dans le second (taux supérieur à 30 p. 100), chez 10 malades (4 cas de filariose, 3 cas d'ascaridiose, 1 cas d'ankylostomose), l'hyperéosinophilie a été irréductible dans 8 cas (80 p. 100).

Ces données tendraient à faire ressortir, ce qui d'ailleurs serait pertinent, que, parmi les hyperéosinophilies parasitaires, celles dont le taux est faible ou modéré, sont, le plus souvent, réductibles par l'ACTH, alors que celles dont le taux est élevé sont, le plus souvent, irréductibles dans les mêmes conditions.

L'inconstance de la réponse des hyperéosinophilies parasitaires à l'ACTH, à l'intérieur de chaque groupe (hyperéosinophilie de taux inférieur à 20 p. 100, hyperéosinophilie de taux supérieur à 30 p. 100) n'est pas pour surprendre, étant donné ce que l'on sait de l'irrégularité des réponses de l'organisme pathologique aux incitations hormonales. Cette inconstance explique que, dans la casuistique, on puisse relever des hyperéosinophilies dont le taux est supérieur à 30 p. 100, qui soient réductibles par l'ACTH (test de Thorn) et des hyperéosinophilies, dont le taux est inférieur à 20 p. 100, qui se montrent irréductibles dans les mêmes conditions.

H. Galliard et M. Larivière [25] ont bien mis ces faits en évidence, en étudiant le test de Thorn à l'ACTH, chez 15 sujets atteints d'helminthiases éosinophilogènes. Ces auteurs notent, dans 2 cas d'hyperéosinophilies profondes (32 et 59,6 p. 100), un test positif, alors que, dans 3 cas d'éosinophilies, dont le taux est peu éloigné de la normale (7, 7,8 et 8,5 p. 100), le test est négatif.

Si, d'ailleurs, on examine le problème des variations de la réponse de l'organisme normal au test de Thorn à l'ACTH, on est conduit, avec H. Galliard, à concevoir que les facteurs raciaux ont leur incidence sur la fréquence de la réductibilité de l'éosinophilie ; nous avons, avec H. Floch et F. Litalien, en particulier, montré que, chez des enfants normaux (sujets de 7 à 13 ans) de race noire, ou métissés de race noire (11 cas), le test de Thorn (25 mg d'ACTH) est plus souvent négatif que chez les sujets de race blanche.

La conclusion qui s'impose, à l'issue de l'examen analytique des observations d'épreuves ou de traitements, par l'ACTH et par la cortisone, dans les hyperéosinophilies parasitaires, est que l'irréductibilité de ces éosinophilies prédomine sur leur labi-

lité. Cependant, lorsqu'on est en présence d'infestations parasitaires suscitant des éosinophilies discrètes (*tæniasis*, *botriocéphalose*, *oxyurose*), la réductibilité est plus fréquente que l'irréductibilité.

Hyperéosinophilies secondaires non parasitaires.

L'étude comparée des hyperéosinophilies secondaires non parasitaires et des hyperéosinophilies parasitaires doit, selon nous, prendre pour base les trois termes qui nous ont servi à situer les hyperéosinophilies parasitaires :

1° Fréquence de l'hyperéosinophilie ; 2° évolution chronologique et épisodique de l'éosinophilie ; 3° résistance des hyperéosinophilies aux actions hormonales.

Il est bien évident que ces trois groupes de caractères ne sont pas exhaustifs et que les éosinophilies secondaires non parasitaires comportent des caractères biologiques et cliniques qui débordent les cadres que nous proposons et qui demanderaient des développements plus considérables. Cependant, pour des raisons d'ordre et de méthode, nous adopterons, dans cette étude, une confrontation des hyperéosinophilies sur les trois versants précités.

I. — L'inconstance de la réponse éosinophilique de l'organisme vis-à-vis d'un facteur éosinophilogène, la streptomycine ou les sels d'or, par exemple, est un caractère qui contraste avec la quasi constance de l'éosinophilie dans les maladies parasitaires. La proportion des réponses positives à une incitation éosinophilogène est variable avec le facteur étiologique considéré ; elle est, habituellement, inférieure à 60 p. 100. Cette constatation n'est pas pour surprendre, étant donné ce que l'on sait de la variabilité au moins quantitative — variabilité pouvant aller de l'inapparence à la manifestation la plus théâtrale — des réactions pathologiques. Reilly (1954) a particulièrement attiré l'attention sur le fait que, sur le plan de la pathologie générale, les réponses à des incitations pouvant aboutir à des phénomènes inflammatoires et même nécrotiques ne s'observaient que dans une proportion de 20 p. 100 à 40 p. 100 des cas et que les réponses à 100 p. 100 étaient exceptionnelles et relevaient davantage des processus physiologiques que de manifestations pathologiques. Il en va ainsi en ce qui concerne les hyperéosinophilies non parasitaires.

Dans les éosinophilies des dermatoses pouvant être éosinophilogènes, comme le psoriasis, les dermatoses bulleuses (maladie de Duhring), et certaines éruptions médicamenteuses, le nombre des malades qui répondent par une hyperéosinophilie sanguine ou locale est inférieur à 50 p. 100.

Les hyperéosinophilies de la convalescence des maladies infectieuses ne s'observent que dans moins de 20 p. 100 des cas, sauf en ce qui concerne la scarlatine, dans laquelle l'éosinophilie de la convalescence est pratiquement constante.

Les éosinophilies des intoxications endogènes ou exogènes (intoxications par le benzol, diathèse asthmatique et rhumatismale) ne se constatent que chez moins de 50 p. 100 des malades.

Dans les éosinophilies d'origine thérapeutique, comme les éosinophilies provoquées par la streptomycine, les sels d'or, l'hépatothérapie, ce sont, environ, 30 p. 100 des individus traités qui répondent, et, dans les manifestations allergiques, ce sont des chiffres comparables que l'on enregistre.

En ce qui concerne l'éosinophilie tropicale dont l'étiologie n'a pu être encore définitivement précisée mais qui, comme le dit G. Lavieq, constitue un syndrome destiné à être démembré, il est difficile d'apporter, même une présomption, au sujet de la fréquence par rapport à une cause éosinophilogène; cependant, si l'on admet que la nature de l'éosinophilie tropicale est, pour partie, allergique ou dystrophique (insuffisance multiglandulaire), il semble qu'elle doive être rangée dans la catégorie des éosinophilies inconstantes par rapport à l'incitation éosinophilogène.

Dans les hyperéosinophilies provoquées par les rayons X et le radium qui constituent, d'ailleurs, un signe d'alarme, la proportion des sujets réagissants apparaît, au contraire, comme élevée.

L'expérimentation confirme l'inconstance des réponses éosinophiliques aux incitations éosinophilogènes non parasitaires. R. Deschiens et M. Poirier (1953) [*loc. cit.*] (1954) [26], ont montré que, dans la sensibilisation du cobaye par l'extrait de piment de Guinée (*Capsicum annum*) et par l'extrait de tabac, l'apparition de l'éosinophilie ne s'observe que dans 40 p. 100 des cas. R. Deschiens et E. Lambault [27], en utilisant, dans le même but, la streptomycine, notent l'hyperéosinophilie dans 30 p. 100 des cas environ.

II. — *L'ordre de grandeur de l'éosinophilie dans les hyperéosinophilies non parasitaires est généralement faible, si on compare les taux constatés à ceux qui sont notés dans les hyperéosinophilies parasitaires.*

Dans les éosinophilies non parasitaires, le taux de l'éosinophilie sanguine dépasse rarement 15 p. 100 et le maximum de fréquence est de l'ordre de 8 à 10 p. 100; tel est le cas des éosinophilies des dermatoses, des états allergiques et des intoxications. L'hyperéosinophilie ayant pour origine l'action des rayons X et du radium se situe entre 5 p. 100 et 20 p. 100.

Les éosinophilies expérimentales du cobaye par sensibilisation au piment, à la streptomycine, au tabac peuvent atteindre des taux notablement plus élevés ; R. Deschiens et M. Poirier (1953) ont relevé des chiffres de l'ordre de 25 à 30 p. 100, dans ce cadre de données.

La courbe évolutive des éosinophilies non parasitaires n'a pas fait l'objet de recherches analytiques et synthétiques comparables à celles qui ont été menées par G. Lavier dans les éosinophilies parasitaires. Cependant, la casuistique clinique et les recherches expérimentales sur l'animal, en particulier celles de R. Deschiens et M. Poirier (1954) sur le cobaye, conduisent à penser que l'évolution de l'hyperéosinophilie non parasitaire n'a pas, le plus souvent, la systématisation et la régularité de celle de l'éosinophilie parasitaire. Dans les éosinophilies parasitaires, l'infestation permanente par une population d'helminthes confère à l'éosinophilie un caractère durable et profond. Ce caractère de permanence et d'intensité semble beaucoup plus rare dans la plupart des éosinophilies non parasitaires et, particulièrement, dans les éosinophilies des dermatoses, des diathèses, des états allergiques et des intoxications. Ces éosinophilies apparaissent comme des accès d'éosinophilies dont la courbe offre des dents de scie (asthme, eczéma), les éosinophilies parasitaires correspondant plutôt à un état de mal éosinophilique. Il n'y a, cependant pas, répétons-le, entre les deux types d'éosinophilie, une séparation qualitative ; les éosinophilies professionnelles ayant pour origine l'intoxication par le benzol ou l'action des rayons X et du radium, par exemple, suscitent une éosinophilie permanente si la cause étiologique n'est pas écartée. Il en est de même dans l'éosinophilie tropicale *sensu stricto* et dans l'éosinophilie expérimentale du cobaye par le piment de Guinée ou par l'extrait de tabac.

Dans l'hyperéosinophilie obtenue, chez le cobaye, par l'extrait de piment de Guinée (extrait aqueux à 5 p. 100) et par l'extrait de tabac (extraits aqueux à 10 p. 100), les conditions expérimentales, qui comportent des injections intramusculaires de 1 cm³ par kilogramme, tous les deux jours, pendant dix à vingt jours, se rapprochent d'une imprégnation continue de l'organisme par une substance éosinophilogène telle qu'elle est réalisée dans les infestations parasitaires. Il n'est pas insolite, dans ces conditions, de constater que la courbe évolutive de l'éosinophilie de l'intoxication par le tabac et par le piment de Guinée se rapproche de celle des infestations parasitaires ; cette courbe présente une période de latence, une période d'ascension et un long plateau s'abaissant en pente douce et conduisant peu à peu à une éosinophilie voisine de la normale, lorsque l'incitation éosinophilogène est suspendue.

III. -- *La labilité habituelle* des éosinophilies non parasitaires à l'action des hormones corticotrope hypophysaire (ACTH) et cortico-surrénale (cortisone) contraste avec la fréquente irréductibilité des éosinophilies parasitaires.

Cette différence de comportement, en général, ne doit pas conduire, là encore, à considérer qu'il y ait une différence essentielle entre les deux groupes d'hyperéosinophilie. Nous avons vu, en effet, que quelques hyperéosinophilies parasitaires sont labiles, celles du téniasis en particulier, alors que certaines éosinophilies cliniques non parasitaires, comme celles du radium et de l'intoxication benzolique, se montrent souvent irréductibles. Les infestations parasitaires suscitent un processus réactionnel le plus souvent profond et permanent correspondant à des éosinophilies *le plus fréquemment* irréductibles ; les hyperéosinophilies non parasitaires, à étiologies d'ailleurs très diverses, semblent, au contraire, correspondre, dans un grand nombre de cas, à des phénomènes réactionnels périodiques ou discontinus, n'entraînant que des éosinophilies *le plus souvent* labiles. C'est donc, en dernière analyse, la fréquence de la labilité ou la fréquence de l'irréductibilité qui constitueraient l'un des éléments de la discrimination des éosinophilies parasitaires et des éosinophilies non parasitaires.

La fréquence de la labilité des hyperéosinophilies non parasitaires ressort de l'expérimentation et de la clinique. Expérimentalement, R. Deschiens et M. Poirier (1953-1954) [*loc. cit.*] ont établi que les hyperéosinophilies obtenues chez le cobaye par l'injection intramusculaire d'extraît de piment de Guinée (9 injections de 1 ml d'extraît à 5 p. 100 par kilogramme) et par l'extraît de tabac (7 injections de 1 ml d'extraît à 10 p. 100 par kilogramme) étaient réductibles par 3 mg par kilogramme de poids d'ACTH, pendant trois jours, et par la cortisone, à la dose de 5 mg par kilogramme de poids pendant quinze jours. R. Deschiens et E. Lambault (1954) ont, d'autre part, fait connaître que les hyperéosinophilies provoquées chez le cobaye par la streptomycine (7 injections de 30 mg par kilogramme de poids) étaient corrigées par l'ACTH (test de Thorn positif), à la dose de 0,5 mg par kilogramme de poids.

En clinique humaine, R. Deschiens et J. Mauzé (1953) [*loc. cit.*], instituant, à la Guadeloupe, une épreuve par la cortisone (injection intramusculaire de 50 à 100 mg pour 60 kg de poids, tous les deux jours, pendant quinze jours, dans 9 cas d'éosinophilie tropicale, présumés *non parasitaires*), ont obtenu une réduction de 40 à 90 p. 100 de l'éosinophilie initiale.

R. Deschiens et H. Floch (1954) [*loc. cit.*] ont apporté l'observation de deux cas d'« éosinophilie tropicale », suivis à la Guyane, dans lesquels le test de Thorn à l'ACTH (25 mg) s'est montré

positif. Il n'est, cependant, pas exclu que certains cas d'éosinophilie dite tropicale se montrent irréductibles à l'ACTH et à la cortisone (H. Galliard, J. Lapierre, M. Larivière et R. Berdonneau (1953) [*loc. cit.*]), mais il y a lieu de faire la réserve d'une étiologie parasitaire inconnue de certains des cas d'éosinophilie sous revue.

Dans les éosinophilies corrélatives aux maladies allergiques, l'éosinophilie parfois importante (20 à 30 p. 100 dans l'état de mal asthmatique, par exemple), tombe le plus souvent à zéro sous l'influence de la cortisone, comme l'ont montré, en particulier, F. Coste, F. Delbarre, F. Laurent et F. Lacronique (1950) [28], puis P. Harvier, F. Coste, J. Turiaf, F. Delbarre, G. Basset et Caramanian [29]. Le comportement de l'hyperéosinophilie des asthmatiques, sous l'influence de l'ACTH, est identique, ainsi que l'a établi B. Rose (1950) [30].

Dans les hyperéosinophilies provoquées par les irradiations (radium, rayons X), l'éosinophilie serait, le plus souvent, irréductible par l'ACTH (test de Thorn négatif). Nous avons pu vérifier, personnellement, cette résistance chez deux radiologues présentant des hyperéosinophilies de 15 et 18 p. 100 qui se montrèrent réfractaires à l'épreuve à l'ACTH (25 mg en injection intramusculaire).

★ ★

L'étude comparée des altérations anatomo-pathologiques de la surrénale dans les hyperéosinophilies parasitaires et non parasitaires est d'un intérêt évident, eu égard à l'incidence de la cortisone sur l'éosinophilie.

Les documents de clinique humaine que nous possédons sur cette question sont insuffisants pour qu'il en soit fait état.

Sur le plan expérimental, il existe des données qui, bien que liminaires, sont, cependant, assez précises (R. Deschiens, M. Poirier, L. Lamy et J. Levaditi (1954) [31]).

Dans l'intoxication expérimentale du cobaye (6 animaux) par l'extrait de *Fasciola hepatica*, on voit apparaître une hyperéosinophilie non réductible par l'ACTH et par la cortisone qui peut légitimement être considérée comme une hyperéosinophilie parasitaire. Chez les animaux, les surrénales prélevées montrent des lésions congestives et dégénératives étendues des cellules glandulaires de la couche corticale et, particulièrement, de la zone réticulée.

Dans l'intoxication du cobaye (6 animaux) par le piment de Guinée, on observe une hyperéosinophilie non parasitaire réductible par l'ACTH, par la cortisone et par la pipérazine ; l'autopsie des individus sacrifiés révèle des lésions beaucoup moins importantes de la surrénale que dans l'intoxication par l'extrait de douves. Les altérations consistent, simplement, en une congestion juxtamédullaire et en hyperplasie de la zone réticulée qui pré-

sente de grandes cellules à protoplasme homogène riches en pigment jaune. Ces constatations permettent, d'abord, de présumer la participation d'une atteinte fonctionnelle ou lésionnaire de la surrénale, dans l'établissement d'une hyperéosinophilie, et, en outre, de considérer que des altérations plus ou moins profondes de la glande conditionnent l'irréductibilité ou la labilité d'une hyperéosinophilie.

Conclusions.

Les conclusions pragmatiques et pratiques de l'étude comparée que nous nous sommes proposé de mener à bien sont les suivantes :

A. Une confrontation et un essai de discrimination des hyperéosinophilies cliniques et expérimentales, chez l'homme et chez un certain nombre de Mammifères (chat, chien, cobaye) en fonction de leur étiologie, conduit à distinguer dans ce syndrome hématologique, à manifestations d'ailleurs non seulement hématologiques mais aussi médullaires et tissulaires, deux groupes relativement homogènes, si l'on prend pour base comparative les caractères ci-après :

1° Le degré de fréquence de l'hyperéosinophilie, en fonction de l'agent étiologique éosinophilogène ;

2° L'ordre de grandeur, l'intensité et la courbe évolutive de l'éosinophilie ;

3° La labilité ou l'irréductibilité de l'hyperéosinophilie par les facteurs éosinopéniques hormonaux (hormone corticotrope hypophysaire, ACTH, cortisone).

L'étude des hyperéosinophilies, envisagée sous ces trois versants, amène à séparer, dans une certaine mesure, le groupe des hyperéosinophilies parasitaires et celui des hyperéosinophilies non parasitaires.

B. Dans le groupe des hyperéosinophilies parasitaires :

1° L'hyperéosinophilie est quasi constante, bien que son ordre de grandeur puisse varier en fonction de l'espèce parasitaire, de la densité de l'infestation, des aptitudes réactionnelles de l'hôte et de l'âge de l'éosinophilie.

2° La courbe évolutive de l'éosinophilie a toujours la même forme générale caractéristique, continue et bien étalée sur l'axe du temps, comportant une période de latence, une période d'ascension et une période de chute (G. Lavier).

3° L'hyperéosinophilie est le plus souvent irréductible par l'hormone corticotrope hypophysaire (ACTH) et par la cortisone, lorsque le taux de l'éosinophilie dépasse 30 p. 100 ; elle est, le plus souvent, réductible lorsque le taux est inférieur à 20 p. 100.

C. Si l'on considère maintenant l'ensemble des hyperéosino-

philies non parasitaires, à étiologies diverses et multiples, on peut noter des modalités de fréquence, d'intensité, d'évolution et de réaction qui tendent à les différencier de celles des hyperéosinophilies parasitaires. Ce sont les suivantes :

1° Inconstance de la réponse éosinophilique de l'organisme vis-à-vis de l'agent éosinophilogène (streptomycine, piment de Guinée, tabac, par exemple) ; la réponse peut être de l'ordre de 20 à 60 p. 100 des cas.

2° Ordre de grandeur de l'hyperéosinophilie relativement faible et ne dépassant pas, le plus souvent, un taux des éosinophiles de 20 p. 100 (exception pour l'éosinophilie tropicale) ; tendance à la discontinuité de la courbe évolutive de l'éosinophilie.

3° Fréquence de la labilité par l'hormone corticotrope hypophysaire et par la cortisone.

D. Les discordances constatées entre les caractères d'ensemble des hyperéosinophilies parasitaires et des hyperéosinophilies non parasitaires, ne sont pas péremptoirement distinctives de ces deux groupes.

En effet, dans le groupe des hyperéosinophilies parasitaires, et en fonction de l'espèce parasite (*tæniasis*), les éosinophilies, dont le taux est inférieur à 20 p. 100, sont, le plus souvent, réductibles par les hormones, et, dans le groupe des hyperéosinophilies parasitaires dont le taux est supérieur à 30 p. 100 (*distomatoses*, *ascaridioses*, *filarioses*), des cas de labilité sont constatés.

D'autre part, dans le groupe des hyperéosinophilies non parasitaires (hyperéosinophilies habituellement labiles) certaines, en petit nombre (hyperéosinophilies de l'asthme grave ou de l'irradiation par les rayons X et par le radium), sont marquées et irréductibles.

Il semble que la réponse des hyperéosinophilies à l'interrogatoire par l'hormone hypophysaire corticotrope ou par la cortisone mesure, avant toute chose, la profondeur de l'action toxique ou vulnérante éosinophilogène ; c'est une réponse quantitative et non qualitative. On pourrait ainsi distinguer des hyperéosinophilies par action toxique éosinophilogène profonde et continue, et des hyperéosinophilies par action toxique et éosinophilogène modérée, ou superficielle et discontinue.

Le groupe des hyperéosinophilies parasitaires correspondrait, dans l'ensemble, à des actions toxiques éosinophilogènes profondes ou continues reflétant la permanence de la maladie parasitaire.

Le groupe des hyperéosinophilies non parasitaires rassemblerait des états nosologiques en rapport avec des actions toxiques éosinophilogènes d'intensité moyenne et surtout épi-

dique ; ces éosinophilies seraient, de ce fait, le plus souvent labiles.

E. Du point de vue diagnostique, l'ordre de grandeur élevé, la permanence et l'irréductibilité d'une hyperéosinophilie seraient en faveur d'une étiologie parasitaire, alors que la faible intensité, la variabilité et la labilité d'une hyperéosinophilie conduiraient à une probabilité d'éosinophilie non parasitaire.

F. Les constatations résultant de l'étude anatomo-histo-pathologique de la surrénale dans l'intoxication expérimentale du cobaye par des extraits parasitaires (extrait de *Fasciola hepatica*) et par des extraits non parasitaires (extrait de piment de Guinée, streptomycine, tabac), établissent que, lorsque l'éosinophilie parasitaire se montre irréductible, on note des lésions congestives et dégénératives étendues des cellules glandulaires, alors que, dans les éosinophilies non parasitaires provoquées par l'extrait de piment et par la streptomycine, les altérations, beaucoup moins profondes, se limitent à une congestion juxta-médullaire et à une hyperplasie de la zone réticulée.

Ces données autorisent à penser que, dans les infestations parasitaires à helminthes ou dans les intoxications éosinophilo-gènes, une atteinte fonctionnelle ou lésionnaire de la glande surrénale participe à l'installation ou à la disparition du syndrome hématologique d'hyperéosinophilie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. JAUSION, HUGONOT et R. SOHIER. *Ann. Dermatol.*, 1929, **40**, 1.
- [2] L. DEROBERT. *L'éosinophilie générale et locale*. J. B. Baillière et fils, édit. Paris, 1942.
- [3] G. LAVIER. *Le Sang*, 1944-1945, **46**, 510.
- [4] J. GUILHON, P. DE GRACIANSKY et A. PARAF. *La Presse Médicale*, 1948, n° 38, 448.
- [5] R. DESCHIENS et M. POIRIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **447**, 1059.
- [6] R. DESCHIENS et M. POIRIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **447**, 1021.
- [7] R. DESCHIENS et E. LAMBAULT. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **448**, 1609.
- [8] G. LAVIER. *Bull. Acad. Méd.*, 1945, **129**, 269.
- [9] R. DESCHIENS et M. POIRIER. *Ces Annales*, 1952, **83**, 725.
- [10] H. GALLIARD, J. LAPIERRE, R. BERDONNEAU et M. LARIVIÈRE. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 639.
- [11] H. GALLIARD, J. LAPIERRE, M. LARIVIÈRE et R. BERDONNEAU. *Ann. Parasitol.*, 1953, **28**, 372.
- [12] H. GALLIARD et R. BERDONNEAU. *Ann. Parasitol.*, 1953, **28**, 163.
- [13] R. DESCHIENS et H. FLOCH. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954 (sous presse).
- [14] KOERBER. Communication orale.
- [15] E. MONTESTRUC et R. BERDONNEAU. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954 (sous presse).

- [16] R. DESCHIENS et J. MAUZÉ. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 214, et *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1953, **137**, 110.
- [17] R. DESCHIENS, L. LAMY et J. ESTIVAL. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1953, **137**, 308.
- [18] P. MOLLARET, cité par R. DESCHIENS et J. MAUZÉ (*loc. cit.*).
- [19] F. DELBARRE. *Conf. Ecole nat. Santé publ.*, 1950 (cité par H. GALLIARD, 1953).
- [20] M. A. LUONGO, D. H. REID et W. S. WEISS. *New England J. Med.*, 1951, **245**, 757.
- [21] W. M. DAVIS et H. MOST. *Am. J. Med.*, 1951, **11**, 639.
- [22] J. WARTER et R. MOISE. *Soc. Méd. Strasbourg*, séance du 31 janvier 1953.
- [23] A. TELKKA, S. WAHLSTROM et R. KOULUMIES. *Ann. Med. Intern. Fenniae*, 1951, **40**, 305.
- [24] R. DESCHIENS et F. LITALIEN. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1955 (sous presse).
- [25] H. GALLIARD et M. LARIVIÈRE. *Ann. Parasitol.*, 1953, **28**, 312.
- [26] R. DESCHIENS et M. POIRIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148** (sous presse).
- [27] R. DESCHIENS et E. LAMBAULT. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148** (sous presse).
- [28] F. COSTE, F. DELBARRE, F. LAURENT et M^{ne} F. LACRONIQUE. *La Presse Médicale*, 1950, **58**, 1337.
- [29] P. HARVIER, F. COSTE, J. TURIAF, F. DELBARRE, G. BASSET et CARAMANIAN. *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1950, **66**, 1447.
- [30] B. ROSE. *Proc. first clinical ACTH Conference*, Chicago, 1950, 491.
- [31] R. DESCHIENS, M. POIRIER, L. LAMY et J. LEVADITI. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 954.

EFFETS EXERCÉS PAR LA PATULINE ET DES MÉLANGES PATULINE-CYSTÉINE SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES CELLULES PHAGOCYTAIRES

PAR ALBERT DELAUNAY, PHILIPPE DANIEL, CATHERINE DE ROQUEFEUIL
et MICHELLE HÉNON (*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches)

On désigne sous le nom de *patuline* (P. M. : 142) une substance extraite de différents *Penicillium* (en particulier *Penicillium patulum*), qui a été beaucoup étudiée pendant la dernière guerre en Angleterre, aux Etats-Unis et en Allemagne. On lui connaît plusieurs synonymes, par exemple la *mycoïne*, la *claviformine*, la *clavatine*, la *clavacine*, etc. Elle est douée d'un pouvoir antibiotique assez marqué ; malheureusement, elle est aussi toxique. Aussi, son emploi en clinique reste-t-il très restreint.

La patuline est douée d'un pouvoir toxique au moins en partie parce qu'elle est à même d'exercer une certaine action antimittotique. Précisément, dans une note antérieure [4], deux d'entre nous ont étudié cette action. On sait que le pouvoir antibiotique de la patuline est neutralisé par la cystéine ; il était intéressant de savoir s'il en allait de même pour son pouvoir antimittotique. Les résultats alors obtenus peuvent être résumés ainsi :

a) Le mélange patuline-cystéine est capable de bloquer la mitose en métaphase comme le fait la patuline seule (on peut donc dissocier, pour ce produit, pouvoir antibiotique et pouvoir antimittotique).

b) Cependant, le mélange, étudié comparativement, se montre beaucoup moins cytotoxique ; il laisse un grand nombre de cellules vivantes.

Ce point une fois acquis, il nous a paru curieux de savoir l'effet que pourraient exercer la patuline et des mélanges patuline-cystéine, non plus cette fois sur des cellules en voie de division, mais sur des cellules adultes. Notre choix s'est naturelle-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1955.

ment porté sur les éléments que nous connaissons le mieux, c'est-à-dire les polynucléaires et les macrophages.

Ce que nous avons découvert dans ces conditions, nous voudrions justement l'exposer ici.

PREMIÈRE PARTIE

Expériences faites avec des polynucléaires.

MATÉRIEL UTILISÉ. TECHNIQUE OPÉRATOIRE GÉNÉRALE.

Nous avons eu recours à des polynucléaires *de cobaye* prélevés dans une cavité péritonéale enflammée (l'irritation de la séreuse avait été produite par deux injections de bouillon stérile faites, l'une cinq heures, l'autre deux heures plus tôt). L'exsudat chargé de cellules, réparti en un certain nombre de tubes (2 ml), était centrifugé aussitôt et les culots repris par un mélange de sérum et d'une solution de patuline ou d'un mélange patuline-cystéine (au total 2 ml).

Les solutions de patuline ou de patuline-cystéine, *en concentrations diverses*, avaient été faites *extemporanément* soit avec de l'eau physiologique (ClNa : 8 g pour 1 000 ml d'eau distillée), soit avec une solution de Earle. Etant donné que les résultats obtenus ont été un peu différents selon l'excipient choisi, donnons ici la formule de la solution de Earle que nous avons utilisée :

Chlorure de sodium	6,80
Chlorure de potassium	0,40
Chlorure de calcium	0,20
Sulfate de magnésium (sec)	0,40
Phosphate monosodique (sec)	0,125
Bicarbonate de sodium	2,20
Glucose	1
Eau distillée	1 000 ml
Rouge de phénol	0,025

Patuline ou patuline-cystéine se sont parfaitement dissoutes en donnant des solutions limpides.

Ces solutions ont été ajoutées, en quantités égales, à un mélange de sérum *frais* de cobaye (1 ml + 1 ml).

Les pH des mélanges ont été, en tout cas, soigneusement pris. Donnons, en exemple, les chiffres suivants :

1° 1 ml sérum frais de cobaye + 1 ml solution de patuline (100 µg) en eau physiologique : PH : 8,2.

2° 1 ml sérum frais de cobaye + 1 ml solution de patuline (100 µg) en solution de Earle : pH : 8,5.

3° 1 ml sérum frais de cobaye + 1 ml mélange patuline (100 µg)-cystéine (200 µg) en eau physiologique : pH : 8.

4° 1 ml sérum frais de cobaye + 1 ml mélange patuline (100 µg)-cystéine (200 µg) en solution de Earle : pH : 8,3.

Dans ces zones de pH, les polynucléaires se trouvent normalement très à l'aise ; il va sans dire que toutes nos expériences ont eu lieu avec des cellules en excellent état.

Les préparations leucocytes-sérums-produits à tester une fois faites, 1 goutte de la suspension était prélevée et déposée sur une lame à la surface de laquelle avaient été fixés au préalable par dessiccation des grains d'*amidon de pomme de terre*. La goutte était recouverte d'une lamelle. Celle-ci était lutée pour éviter toute dessiccation. Enfin la préparation était conservée pendant une heure à 37°. On sait que, dans ces conditions, *lorsque tout se passe normalement* [2], les polynucléaires, quittant la place où le hasard les avait mis, se dirigent vers les grains d'amidon. Le phénomène se déroule très rapidement, si bien que, si l'on reprend la lame qui a séjourné une heure à 37° et qu'on l'examine au microscope, on remarque que la plupart des cellules sont cette fois groupées autour des grains d'amidon. Autrement dit, on se trouve là en présence d'un magnifique phénomène de *chimiotactisme positif*. Au contraire, en cas de réactions anormales (milieu imparfait ou toxique, cellules en mauvais état physiologique), ce tactisme n'a pas lieu ; les cellules, déformées ou non, restent sur place ; de plus, dans un certain nombre de cas, le simple examen au microscope optique montre des altérations manifestes du protoplasme et du noyau.

Qu'allait-il se passer au cours des expériences ici relatées ? En présence de patuline ou du mélange patuline-cystéine, les cellules montreraient-elles un tactisme normal (que nous désignons généralement par 4 +) ou apparaîtraient-elles plus ou moins « figées » sur place ? Voilà exactement ce que nous désirions savoir.

Cependant, nous n'avons pas voulu nous contenter ici de ces simples manifestations de chimiotactisme positif ou nul. Nous avons tenu à étudier encore le *processus phagocytaire*. Pour cela, les lames une fois préparées comme nous l'avons dit ci-dessus, nous avons ajouté aux tubes contenant le sérum les cellules, la patuline ou le mélange patuline-cystéine, quelques gouttes d'une suspension en eau physiologique de *grains d'amidon de riz*. Ces grains qui, à l'opposé des grains d'amidon de pomme de terre sont tout petits, se prêtent parfaitement, *dans les conditions normales*, à une étude de la phagocytose. En moins d'une heure (à 37°), on peut dire qu'ils sont presque tous absorbés par les polynucléaires. Pour s'en rendre compte, il suffit de prélever 1 goutte de la préparation, de la déposer entre lame

et lamelle et d'examiner le tout au microscope optique avec un grossissement moyen. Ce qu'on trouve alors est parfaitement beau : la plupart des phagocytes portent dans leur sein 1 ou 2 ou 3 petites boules brillantes et il n'y a plus de grains d'amidon autour d'eux.

En présence de patuline ou du mélange patuline-cystéine, qu'allait-il se passer ? La phagocytose de l'amidon serait-elle normale (ce que nous désignons habituellement par 4 +) ou anormale ? Nous étions fort curieux de l'apprendre.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — *Examen du tactisme et de la phagocytose des polynucléaires en présence de diverses concentrations de patuline en solution dans l'eau physiologique ou dans la solution de Earle.*

Se reporter, pour connaître le protocole détaillé et les résultats, au tableau I.

TABLEAU I.

NUMÉRO des préparations	NATURE DE L'EXCIPIENT qui a servi à reprendre le culot leucocytaire	IMPORTANCE du tactisme	IMPORTANCE de la phagocytose
1	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (100 μ g) in eau phy- siologique.	0	0
2	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (10 μ g) in eau phy- siologique.	0	\pm
3	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (2 μ g) in eau physio- logique.	— — —	— — —
4	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (0,1 μ g) in eau phy- siologique.	+ + + +	— — —
5	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (100 μ g) in liquide de Earle.	0	0
6	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (10 μ g) in liquide de Earle.	0	\pm
7	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (2 μ g) in liquide de Earle.	+ + + +	+ + -
8	1 ml sérum pur + 1 ml solution de patuline (0,1 μ g) in liquide de Earle.	+ + + +	+ + - -

L'examen de ce tableau révèle les faits suivants :

1° Moins de 5 μ g de patuline par millilitre suffisent à supprimer totalement le pouvoir chimiotactique et presque totalement le pouvoir phagocytaire des polynucléaires.

Résultat extraordinaire, nous tenons à le souligner. Dans

l'état actuel des choses, en effet, malgré les innombrables expériences que nous avons faites en ce domaine depuis quinze ans, *jamais* (à beaucoup près) nous n'avons trouvé un corps aussi actif.

2° La toxicité de la patuline, en milieu de Earle, semble un peu moins grande qu'en milieu simplement chloruré.

3° Ajoutons qu'en présence de 50 et même de 5 μg de patuline, les polynucléaires, non seulement cessent de se mouvoir et de phagocyter, mais encore apparaissent morphologiquement très altérés. Fait curieux, le noyau reste souvent invisible; ce qui frappe surtout, c'est la présence, autour de la cellule, de petites « boules » qui ne sont pas sans rappeler celles qu'a décrites il y a quelques années Schreck, mais sur la nature desquelles il reste quasi impossible de se prononcer. Autre remarque digne d'être mentionnée : les cellules ont peu de tendance à se réunir en amas; elles restent pour la plupart isolées.

SECONDE SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — En culture de tissus [4], le mélange patuline-cystéine se montre proportionnellement beaucoup moins toxique que la patuline seule.

Nous nous sommes donc demandé ce que deviennent le *tactisme* et la *phagocytose exercés par les polynucléaires en présence de différents mélanges patuline-cystéine*.

Cette fois encore, pour connaître le protocole détaillé et les résultats, se reporter au tableau II.

TABLEAU II.

NUMÉRO des préparations	NATURE DE L'EXCIPIENT qui a servi à reprendre le culot leucocytaire	IMPORTANCE du tactisme	IMPORTANCE de la phagocytose
1	1 ml sérum pur + 1 ml eau physiologique contenant 100 μg de patuline et 200 μg de cystéine.	0	0
2	1 ml sérum pur + 1 ml eau physiologique contenant 10 μg de patuline et 20 μg de cystéine.	— — —	— — —
3	1 ml sérum pur + 1 ml solution de Earle contenant 100 μg de patuline et 200 μg de cystéine.	+ + + +	+ + + +
4	1 ml sérum pur + 1 ml solution de Earle contenant 10 μg de patuline et 20 μg de cystéine.	— — + —	— — — —

Conclusions. — 1° Le chlorhydrate de cystéine se montre capable, au moins jusqu'à un certain point, d'inhiber l'action toxique exercée ici par la patuline. Lorsque, malgré la cystéine, l'action toxique parvient à se manifester encore, on retrouve,

au niveau des cellules, les « boules » curieuses que nous avons décrites plus haut.

2° Remarque intéressante mais pour laquelle nous ne pouvons fournir encore aucune explication : l'action antitoxique exercée ici par la cystéine se montre plus nette dans la solution de Earle que dans l'eau simplement chlorurée.

3° En quoi consiste cette action antitoxique ? Qu'il y ait combinaison de l'acide aminé avec l'antibiotique, beaucoup de preuves l'établissent (par exemple, la réaction au nitroprussiate de sodium, faite alors, est abolie). Mais peut-on ajouter que, si la patuline empêche tactisme et phagocytose des polynucléaires, c'est uniquement parce qu'elle a la faculté de se combiner avec les groupements sulfhydriles (ce qui, du même coup, indiquerait que l'intégrité de ces groupements est indispensable pour que les cellules en question puissent manifester leurs principales propriétés physiologiques) ? Le fait est certes possible. Il ne serait pas incroyable. Il nous paraîtrait néanmoins imprudent de l'affirmer dès à présent.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Celle-ci a été faite avec le désir de préciser certaines des notions recueillies ci-dessus.

1° *Essai pour déterminer la plus faible dose de patuline capable de supprimer le pouvoir chimiotactique des polynucléaires.*

Les observations ici faites sont reportées dans le tableau III.

TABLEAU III.

NUMÉRO des préparations	NATURE DE L'EXCIPIENT qui a servi à reprendre le culot leucocytaire	IMPORTANCE du tactisme	IMPORTANCE de la phagocytose
1	1 ml sérum pur + 0,5 ml eau physiologique + 0,5 ml solution Earle contenant 10 µg de patuline.	+	+
2	1 ml sérum pur + 0,6 ml eau physiologique + 0,4 ml solution Earle contenant 10 µg de patuline.	++±	+++
3	1 ml sérum pur + 0,7 ml eau physiologique + 0,3 ml solution Earle contenant 10 µg de patuline.	++++	++++

Remarque. — En 1 et 2, légères agglutinations des cellules. Noyaux invisibles. Quelques « boules » en 2 ; « boules » un peu plus nombreuses en 1.

Conclusions. — L'expérience précédente indique que la dose toxique limite de la patuline pour les polynucléaires doit être placée autour de 2 µg par millilitre.

Nous tenons à répéter que nous nous trouvons là devant une

action réellement extraordinaire. Nous n'en connaissons pas, personnellement, d'autres exemples.

2° *Des polynucléaires qui ont été maintenus une heure en présence de doses subtoxiques de patuline retrouvent-ils leurs propriétés physiologiques normales quand on vient à les replacer dans un milieu convenable ?*

Pour le savoir, nous avons fait l'expérience suivante :

Les préparations ci-dessus 1, 2 et 3 sont centrifugées après avoir été gardées une heure à 37°. Les trois culots sont repris par 2 ml de sérum de cobaye frais, pur. 1 goutte des préparations nouvellement faites est alors déposée sur lame pour une expérience de tactisme.

Résultats (au bout d'une heure) :

En 1, nombreuses cellules agglutinées, noyaux invisibles, cellules assez régulièrement arrondies, sans « boules » à leur périphérie. Tactisme : +.

En 2, mêmes observations. Seulement tactisme, un peu plus beau : ++ ±.

En 3, cellules apparemment saines ; tactisme normal.

Conclusion. — L'altération cellulaire produite par la patuline n'est pas seulement fonctionnelle. Il y aurait véritable lésion ; celle-ci persisterait même après élimination du toxique, si bien que les cellules, une fois atteintes par celui-ci, demeurent pour toujours anormales.

QUATRIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Sorte de série témoin. Ont été mis en œuvre deux corps fort différents l'un de l'autre : d'une part l'actinomycine, de l'autre le bichlorure de mercure.

Le second a été choisi parce qu'il est considéré très généralement comme un poison violent des cellules.

TABLEAU IV.

NUMÉRO des préparations	NATURE DE L'EXCIPIENT qui a servi à reprendre le culot leucocytaire	IMPORTANCE du tactisme	IMPORTANCE de la phagocytose
1	1 ml sérum pur + 1 ml solution d'actinomycine (100 µg) in eau physiologique.	++ ±	+++
2	1 ml sérum pur + 1 ml solution d'actinomycine (50 µg) in eau physiologique.	+ - +	++++
3	1 ml sérum pur + 1 ml solution d'actinomycine (10 µg) in eau physiologique.	+++ +	++++
4	1 ml sérum pur + 1 ml solution d'actinomycine (2 µg) in eau physiologique.	---- +	++++

Le premier méritait d'être essayé de son côté, compte tenu de son origine et de son action anticancéreuse (présumée).

1° *Essai avec l'actinomycine*. — Voir le protocole détaillé et les résultats dans le tableau IV.

Conclusion. — L'actinomycine, même à dose relativement forte, n'exerce qu'une action nocive fort discrète sur les polynucléaires (à en juger du moins par la façon dont continuent de se manifester tactisme et phagocytose).

Le contraste avec ce qui a été observé ci-dessus avec la patuline est réellement frappant.

2° *Essai avec le bichlorure de Hg* (P. M. : 271,6). — La solution mère préparée renferme 1 000 μg par millilitre (solution parfaite en eau physiologique). Cette solution, plus ou moins diluée, est mélangée en parties égales avec du sérum frais de cobaye (1 ml).

Se reporter, pour le protocole détaillé et les résultats, au tableau V.

TABLEAU V.

NUMÉRO des préparations	QUANTITÉ DE BICHLORURE de mercure se trouvant dans le liquide qui a servi à reprendre le culot leucocytaire	IMPORTANCE du tactisme	IMPORTANCE de la phagocytose
1	500 μg	0	0
2	50 μg	0	0
3	25 μg	\pm	+
4	12,5 μg	+++	+++
5	5 μg	++++	++++
6	1 μg	++++	++++

Remarque : Dans les préparations n° 3 et surtout nos 1 et 2, nombreuses cellules mortes et très altérées. Noyau parfaitement visible. Donc état fort différent de celui que donnent des doses toxiques de patuline.

Conclusions. — Le bichlorure de mercure, à doses convenables, est parfaitement capable d'altérer profondément des polynucléaires de cobaye. Mais cette action est très différente de celle de la patuline. D'une part, elle est proportionnellement plus faible. D'autre part, elle doit reposer sur un mécanisme tout à fait distinct. Dans le cas de la patuline, on a l'impression que c'est un rouage essentiel de la vie cellulaire qui est frappé (et c'est précisément en cela que réside l'intérêt de l'étude du produit en cause). A l'opposé, le bichlorure manifeste une action brutale, sans nuances. Ici, c'est toute la cellule, dans son ensemble, qui est blessée à mort.

SECONDE PARTIE

Expériences faites avec des macrophages.

MATÉRIEL UTILISÉ. TECHNIQUE OPÉRATOIRE SUIVIE.

Des cobayes de 400 g, en excellent état, reçoivent par voie intrapéritonéale 18 ml d'huile de paraffine. Quatre jours plus tard, les animaux sont sacrifiés et le péritoine incisé. La séreuse est lavée avec de l'eau physiologique. Le liquide de lavage est centrifugé et seul le culot est conservé. Il se compose d'innombrables cellules qui sont, pour la plupart, des macrophages. Le culot, repris par du sérum frais de cobaye, est réparti dans une série de tubes à raison de 1 ml par tube. A chaque tube est ajouté, sous un même volume, une solution de patuline en eau physiologique plus ou moins concentrée. Dans tous les tubes sont alors placées quelques gouttes d'une suspension en eau physiologique de grains d'amidon de riz. Tous les mélanges sont soigneusement agités, puis placés dans une étuve à 37°. Une heure plus tard, les préparations sont reprises. 1 goutte, prélevée dans chacune d'elles, est déposée entre lame et lamelle. Le tout est porté sur la platine d'un microscope. Un examen est finalement fait qui détermine l'importance de la phagocytose des grains d'amidon de riz par les macrophages.

TABLEAU VI.

NUMÉRO des préparations	VOLUME ET NATURE de l'excipient qui a servi à remettre en suspension les macrophages	IMPORTANCE de la phagocytose
1	1 ml sérum pur + 1 ml solution patuline (100 μ g) in eau physiologique.	0 (cellules gonflées et mortes).
2	1 ml sérum pur + 1 ml solution patuline (10 μ) in eau physiologique.	0 (cellules gonflées et mortes).
3	1 ml sérum pur + 1 ml solution patuline (5 μ g) in eau physiologique.	++ (cellules en assez bon état).
4	1 ml sérum pur + 1 ml solution patuline (2 μ g) in eau physiologique.	++++ (cellules en très bon état).
5	1 ml sérum pur + 1 ml solution patuline (1 μ g) in eau physiologique.	++++ (cellules en très bon état).

Pour les résultats, se reporter au tableau VI.

Conclusions. — Le pouvoir toxique de la patuline, si net sur les polynucléaires, se manifeste non moins bien quand se trouve en cause l'autre grand type de cellules phagocytaires : les *macrophages*.

On admet en général que les macrophages sont des éléments plus résistants que les polynucléaires. Ce fait d'expérience ne se vérifie pourtant pas ici puisque, quel que soit le type de cellules considéré, la dose subtoxique de patuline reste la même.

TROISIÈME PARTIE

Influence de la patuline sur le métabolisme respiratoire des leucocytes.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la patuline a le pouvoir de se combiner aux groupements sulphydriles des enzymes, en particulier des enzymes respiratoires. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier, en complément de ce qui précède, ce que devenait, en présence du produit, la respiration des polynucléaires.

MATÉRIEL UTILISÉ. TECHNIQUE OPÉRATOIRE SUIVIE.

Nous avons eu recours à la méthode manométrique de Warburg.

Les globules blancs avaient été retirés d'exsudats péritonéaux provoqués par notre technique habituelle (injections d'eau peptonée stérile dans le péritoine de cobayes).

Lavées deux fois à l'eau physiologique, les cellules étaient finalement remises en suspension dans un tampon Ringer-phosphate de pH : 7. Selon nos expériences, les suspensions en cause renfermaient par millimètre cube de 40 à 70 000 éléments. La patuline, en solution, était mise au contact des cellules en concentrations variables.

Les lectures barométriques ont été poursuivies pendant une heure trente. A la fin de chaque expérience, l'intensité du métabolisme respiratoire a été exprimée en millimètres cubes d'oxygène consommés par heure et pour 10^6 cellules.

Toutes nos expériences ont eu lieu à 37°.

Résultats : J. D. Hartman [3] a montré que, pour les leucocytes, même en milieu salin, la consommation d'oxygène variait de façon importante selon la concentration cellulaire et en fonction du temps qui s'était écoulé entre le prélèvement et la mise en route de l'expérience. Pour chacun de nos essais, nous avons donc étudié l'action de concentrations variées de patuline sur des leucocytes de même origine. En opérant dans ces conditions,

nous avons pu obtenir des résultats comparables d'une expérience à l'autre.

Le lecteur trouvera, dans les tableaux VII et VIII, des données que nous considérons comme tout à fait caractéristiques. (Se

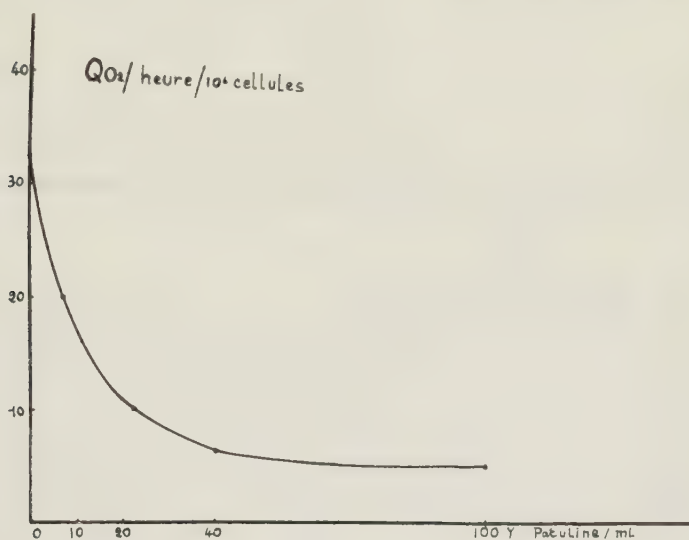


FIG. 1.

reporter aussi à la figure 1 dont la courbe reproduit les données du tableau VII.)

TABLEAU VII.

CONCENTRATION DE LA PATULINE dans le milieu (exprimée en μg par ml)	$QO_2/mm^3/HEURE/10^6$ CELLULES
0	33 ± 2
10	17 ± 2
20	11 ± 2
40	7 ± 2
100	5 ± 2
Nombre de leucocytes dans la suspension : 67 800/mm ³ .	

L'examen des chiffres reproduit dans les tableaux ci-dessus montre :

Pour les doses fortes utilisées, que l'inhibition respiratoire tend vers un maximum mais ne s'annule pas ;

TABLEAU VIII.

CONCENTRATION DE LA PATULINE dans le milieu (exprimée en μg par ml)	$\text{QO}_2/\text{mm}^3/\text{HEURE}/10^6 \text{ CELLULES}$
0	41 ± 2
2,5	34 ± 2
20	16 ± 2
40	14 ± 2
50	14 ± 2

Nombre de leucocytes dans la suspension : 68 460, mm^3 .

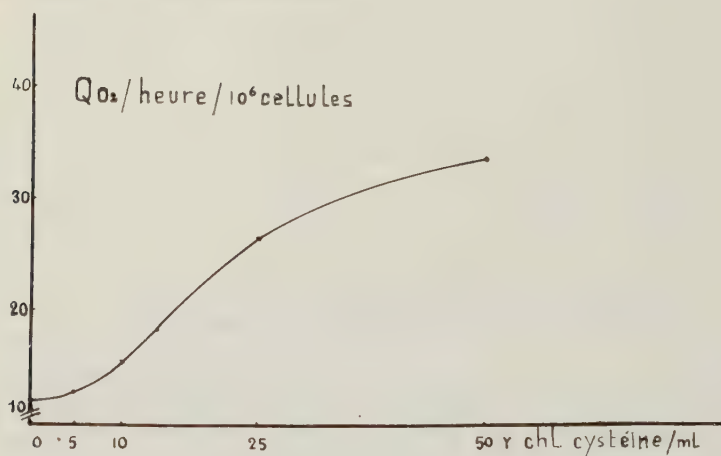


FIG. 2.

Pour les doses faibles, que la diminution de l'intensité respiratoire est déjà sensible à la concentration de 10 μg (en moyenne, nous pouvons dire qu'elle est de l'ordre de 40 p. 100).

Nous avons essayé de déterminer l'intensité respiratoire pour des concentrations plus faibles de patuline, mais sans résultat vraiment net. Ainsi, dans deux expériences, nous avons obtenu :

Avec 2,5 μg , une inhibition de l'ordre de 18 p. 100 ;

Avec 3 μg , une inhibition de 8 p. 100.

Au mieux, pouvons-nous dire, encore avec réserve, que l'inhibition est de l'ordre de 10 p. 100, peut-être même inférieure, pour des concentrations de patuline correspondant à 3 μg par millilitre.

Comme on pouvait s'y attendre, nous avons vu que la présence de cystéine dans le milieu où se trouve la patuline relève l'intensité respiratoire des leucocytes.

Rapportons, à titre d'exemple, l'expérience suivante : à une concentration fixe de patuline (50 μg par millilitre) nous avons ajouté des quantités croissantes de cystéine, allant de 5 à 50 μg . Les résultats obtenus dans ces conditions sont reportés dans le tableau IX et dans la figure 2.

TABLEAU IX.

CONCENTRATION DE LA CYSTÉINE (chlorhydrate) dans le milieu (exprimée en μg par ml)	$\text{QO}_2/\text{mm}^3/\text{HEURE}/10^6$ CELLULES
50	34 ± 2
25	27 ± 2
10	16 ± 2
5	13 ± 2
0	12 ± 2
Nombre de leucocytes dans la suspension : 41 000/mm ³ .	

En conclusion des diverses expériences que nous venons de rapporter, nous dirons que la patuline est capable, en milieu salin, d'inhiber le métabolisme respiratoire d'une suspension leucocytaire, mais que cette action inhibitrice peut être neutralisée par la cystéine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

1° La patuline, substance extraite de divers *Penicillium* et qui est douée d'une double action antibiotique et antimittotique, est capable, à des concentrations extraordinairement faibles, d'inhiber l'activité phagocytaire des polynucléaires et des macrophages et, aussi, la sensibilité chimiotactique des polynucléaires. Pour obtenir ce résultat, en effet, il suffit d'utiliser un milieu qui contient 2 à 3 μg par millilitre de patuline. A notre connaissance du moins, il n'existe pas d'autres substances ayant, à un tel degré, ce pouvoir. Au cours du travail ici rapporté, nous avons étudié comparativement l'action de l'actinomycine et du bichlorure de mercure. Ces deux substances, certes, sont aussi toxiques (surtout le bichlorure) pour les leucocytes, mais elles le sont de façon beaucoup moins intense.

2° Le métabolisme respiratoire des polynucléaires est également perturbé lorsque les cellules sont placées au contact de la patuline. Y a-t-il un rapport entre l'intégrité des enzymes respiratoires et l'intensité des processus phagocytaires ? On peut le penser. Nous hésitons cependant à l'affirmer, étant donné que le tactisme et la

phagocytose sont supprimés alors que la respiration des leucocytes n'est encore que très partiellement inhibée par la patuline.

3° Le pouvoir cytotoxique, si net, de la patuline, peut être supprimé par l'addition au milieu, en concentrations convenables, de chlorhydrate de cystéine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ph. DANIEL, E. LASFARGUES et A. DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, sous presse.
- [2] A. DELAUNAY et J. PAGES. *Ces Annales*, 1946, **72**, 458.
- [3] J. D. HARTMAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **79**, 3.

ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE CERTAINS COMPOSÉS CHIMIQUES ÉTUDIÉE AU MICROBIOPHOTOMÈTRE ENREGISTREUR

par M. FAGUET (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage)

O. Schales et H. Graefe ont récemment décrit l'action antimicrobienne de certains composés chimiques [1], dérivés nitrés des carbures aryl-éthyléniques. Ces auteurs montrèrent, notamment, que le β -nitrostyrène à la concentration de 1 mg pour 100 cm³ de milieu de culture inhibe la croissance de *Micrococcus pyogenes* et d'*E. coli* et que cette action est légèrement réduite quand on ajoute une certaine quantité d'albumine au milieu de culture. Ils utilisèrent pour leur expérimentation le milieu II, assez complexe, de Schmidt et Moyer [2].

Nous avons pensé qu'il était intéressant de reprendre les essais concernant trois des composés décrits, parmi les plus actifs, et utilisant un milieu beaucoup plus simple, l'eau peptonée glucosée, d'étudier leur activité par l'enregistrement des courbes de croissance [3]. Enfin, il nous a paru également profitable de comparer la croissance microbienne obtenue en présence de ces composés avec celle obtenue en présence d'antibiotiques connus comme l'auréomycine et le chloramphénicol.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS.

Parmi les 55 composés décrits par Schales et Graefe, nous en avons choisi trois :

- 2-6-dichlorophényl-nitrostyrène (A) ;
- 3-4-dichlorophényl-nitropropène (B) ;
- p*-nitrophényl-nitropropène (C).

Afin de simplifier le texte, nous désignerons respectivement ces corps par A, B et C.

Nous avons étudié leur activité sur *Staphylococcus albus* et *aureus*, sur *E. coli* (souche M), sur *Proteus* X 19 et sur *Aspergillus fumigatus*.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 novembre 1954.

Avant d'utiliser la technique des enregistrements continus nous avons délimité les zones d'action de chaque composé, par la méthode des dilutions. Le milieu employé fut l'eau peptonée à 3 p. 100, glucosée à 1 p. 200 (peptone Uclaf), le pH étant ajusté à 7,2. Les composés étant insolubles dans l'eau, nous les avons dissous dans l'alcool à 96°.

Le principe de la technique (O. Schales et A. Graefe) des cultures a été le suivant : nous avons ensemencé 10 cm³ de milieu. Nous avons ensuite transféré cette culture dans des tubes stériles contenant 2 cm³ d'eau distillée et 0,1 cm³ de solution alcoolique de la substance testée, à différentes concentrations. Ceci nous permettait d'avoir dans chaque tube une quantité égale d'alcool, qui n'était jamais supérieure à 0,1 cm³ pour 12 cm³ de milieu.

Les cultures étaient portées à l'étuve à 37° C pendant dix-huit

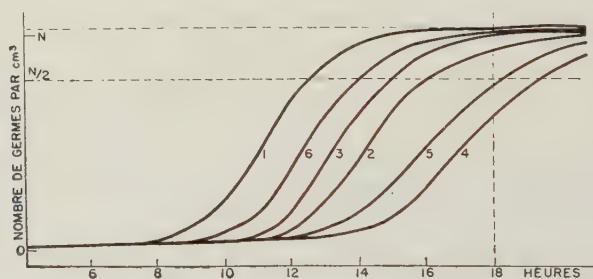


FIG. 1.

heures et examinées ensuite par une méthode turbidimétrique. Nous avons alors recherché les concentrations des composés A, B et C donnant avec les différents germes une inhibition d'environ 50 p. 100 de la croissance, c'est-à-dire donnant approximativement la moitié du nombre de germes obtenus dans le même milieu sans addition des produits A, B, C. Au bout de dix-huit heures, sauf pour *Aspergillus fumigatus* pour lequel la technique a été différente, les résultats obtenus ont été résumés dans les tableaux ci-joints.

Cette étude nous a permis de délimiter les zones minimum d'activité antimicrobienne des trois composés étudiés. Nous avons pensé qu'il pouvait être intéressant d'examiner les courbes de croissance des différents germes étudiés au moyen de la technique des enregistrements continus par le microbiophotomètre enregistreur.

Les six cuves de l'appareil recevaient chacune 20 cm³ d'eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Uclaf) et 1/200 de glucose, préalablement ensemencée avec 5×10^5 germes par centimètre cube

provenant d'une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée. Le pH était ajusté à 7,2.

Dans une première série d'expériences, nous avons enregistré (fig. 1) les courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* (souche O) en présence des substances A, B et C aux doses suivantes :

Cuve 1 : culture témoin de *St. aureus* (souche O).

Cuve 2 : addition de 1 μ g d'auréomycine par centimètre cube.

Cuve 3 : addition de 1 μ g de chloramphénicol par centimètre cube.

Cuve 4 : addition de A à la concentration de 1/1 200 000.

Cuve 5 : addition de B à la concentration de 1/1 200 000.

Cuve 6 : addition de C à la concentration de 1/1 200 000.

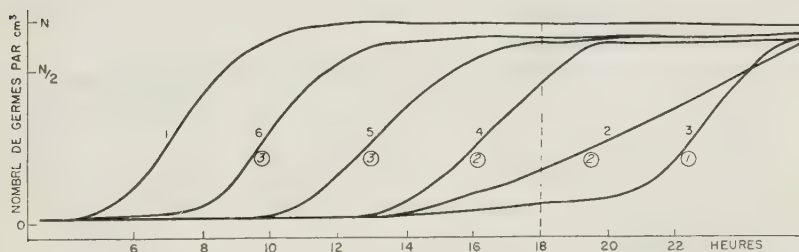


FIG. 2. — Les chiffres 1, 2, 3 entourés d'un cercle représentent respectivement les substances A, B et C. Les chiffres ordinaires 1, 2, 3, 4, 5, 6 indiquent les numéros d'ordre des cuves. Il en est de même pour les figures 1 et 3.

L'examen des courbes de croissance montre bien que la substance A est la plus active ; l'activité de B est presque équivalente et celle de C est nettement inférieure.

TABLEAU I. — Action de A, B et C sur *Staphylococcus aureus* (souche O).

SUBSTANCES	CONCENTRATIONS			
	1/400 000	1/600 000	1/1 200 000	1/2 400 000
A (p. 100).	100	100	80	40
B (p. 100).	100	90	70	30
C (p. 100).	30	10	8	0

Le composé A agit encore sur une concentration inférieure au millionième ; la concentration qui permet une diminution de 50 p. 100 de la culture est comprise entre 1/1 200 000 et 1/2 000 000. Elle est comprise entre 1/1 200 000 et 1/1 500 000 pour B et entre 1/300 000 et 1/400 000 pour C. Ces résultats ont été obtenus pour des cultures placées dix-huit heures à l'étuve 37° C.

Dans une deuxième série d'expériences (fig. 2), nous avons étudié l'action des trois substances A, B et C sur *Proteus* X 19 aux conditions suivantes :

Cuve 1 : culture témoin de *Proteus* X 19.

Cuve 2 : addition de 0,5 µg de chloramphénicol par centimètre cube.

Cuve 3 : addition de A à la concentration de 1/800 000.

Cuve 4 : addition de B à la concentration de 1/800 000.

Cuve 5 : addition de C à la concentration de 1/800 000.

Cuve 6 : addition de C à la concentration de 1/2 400 000.

L'examen de ces concentrations montre que la substance A possède la plus grande activité contre *Proteus* X 19 ; les substances B et C viennent ensuite successivement.

Dans une troisième série d'essais (fig. 3), nous avons enre-

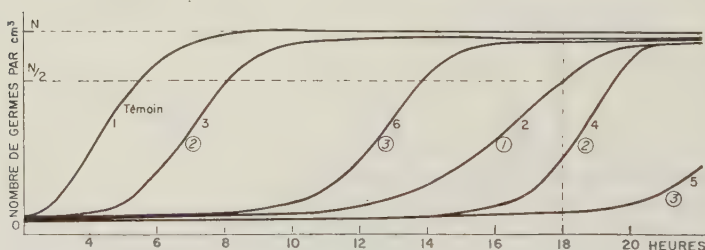


FIG. 3.

TABEAU II. — Action de A, B et C sur *Proteus* X 19.

PRODUITS	CONCENTRATIONS		
	1/500 000	1/900 000	1/1 200 000
A (p. 100).	100	40	20
B (p. 100).	100	50	40
C (p. 100).	95	30	20

La concentration de la culture en composé A, qui permet au bout de dix-huit heures une diminution de 50 p. 100 de la culture témoin sans antibiotique, est comprise : pour A, entre 1/800 000 et 1/900 000 ; pour B, vers 1/900 000 ; pour C, entre 1/500 000 et 1/900 000.

gistré les courbes de croissance d'*E. coli* (souche M), en présence de quantités variables des substances A, B et C :

Cuve 1 : culture témoin d'*E. coli*.

Cuve 2 : addition de A à la concentration de 1/30 000.

Cuve 3 : addition de B à la concentration de 1/30 000.

Cuve 4 : addition de B à la concentration de 1/12 000.

Cuve 5 : addition de C à la concentration de 1/12 000.

Cuve 6 : addition de C à la concentration de 1/30 000.

TABLEAU III. — Action de A, B et C sur *E. coli* (souche M).

SUBSTANCES	CONCENTRATIONS		
	1/10 000	1/20 000	1/40 000
A (p. 100).	100	100	30
B (p. 100).	30 à 40	0 à 40	0
C (p. 100).	100	40 à 50	0

La concentration qui permet une diminution d'environ 50 p. 100 de la croissance de *E. coli*, en dix-huit heures par rapport à une culture témoin, sans antiseptique, est comprise : pour A, entre 1/20 000 et 1/40 000 ; pour B, vers 1/10 000 ; pour C, entre 1/10 000 et 1/20 000.

TABLEAU IV. — Action de A, B et C sur *Aspergillus fumigatus*.

SUBSTANCES	CONCENTRATIONS	
	1/3 000	1/6 000
A (p. 100).	100	100
B (p. 100).	100	80
C (p. 100).	100	40

Cette étude a été faite sur boîtes de gélose. Les composés A, B, C avaient été incorporés à des doses variables à la gélose, à l'état liquide. L'ensemencement avait été fait au moyen d'une goutte de suspension d'*Aspergillus fumigatus* uniformément répartie sur la surface de la gélose. L'examen des boîtes fut fait après sept jours d'étuve à 37° C. Nous avons alors mesuré les surfaces occupées par les cultures. Celles effectuées sans antiseptiques étaient égales à la surface totale de la gélose. Les chiffres du tableau indiquent le pourcentage d'inhibition.

On voit que les concentrations permettant une diminution de 50 p. 100 de la surface de la culture sont : pour A, inférieures à 1/6 000 ; pour B, inférieures à 1/6 000 ; pour C, comprises entre 1/3 000 et 1/6 000.

RÉSUMÉ.

L'étude des trois composés précédents montre qu'ils possèdent une activité antimicrobienne importante puisque le 2-6-dichloro-phényl-nitrostyrène est actif sur *Staphylococcus aureus* (souche O) à la concentration de 1/1 200 000, le 3-4-dichlorophényl-nitro-

propène le suivant de près, le *p*-nitrophényl-nitropropène étant nettement moins actif (1/400 000).

Ces composés présentent une activité encore importante pour le *Proteus* X19 que nous avons utilisé dans nos expériences, puisque tous les trois ont une action nette à des concentrations égales et même inférieures à 1/500 000. A l'égard d'*E. coli*, cette activité est plus faible, puisque les concentrations utiles varient de 1/10 000 à 1/40 000. Enfin, pour *Aspergillus fumigatus* l'action se situe aux environs des concentrations de l'ordre de 1/6 000.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. SCHALES et H. A. GRAEVE. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, n° 18, 4486.
- [2] W. H. SCHMIDT et A. J. MOYER. *J. Bact.* 1944, **47**, 199.
- [3] M. FAGUET. *La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne*. Préface de J. Tréfouël, Hermann édit., 1941, n° 898 et *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **426**, 967.

ACTION DES SUBSTANCES COLORANTES SUR LES MYCOBACTÉRIES

IV. — COLORANTS ACIDES. INFLUENCE DU pH (*).

par J. DESBORDES, Et. FOURNIER et DENISE ALIX (**).

(Laboratoire du Service du D^r JEAN PARAF.
Centre Hospitalier Emile-Roux [Brévannes])

Continuant nos essais [1] au sujet de l'action des substances colorantes sur les Mycobactéries, nous avons étudié le comportement de quelques bacilles du genre *Mycobacterium* mis en contact avec diverses substances classées par les histologistes parmi les colorants acides.

Pour ce faire, dans un tube à hémolyse, nous avons mis le contenu d'environ 1 ou 2 öses de platine de germes prélevés sur une culture à maturité (sur milieu solide, type Löwenstein), lavés à l'alcool méthylique à 50 p. 100, puis émulsionnés dans 2 cm³ d'eau distillée, en contact avec 2 cm³ d'une solution tamponnée à différents pH (soit en zone acide : solution saturée d'acide citrique ; soit en zone neutre ; soit en zone alcaline : solution saturée de CO₃Na₂) et quelques gouttes d'une solution très diluée du colorant utilisé.

Nous observons la couleur du culot bacillaire qui se rassemble, après agitation, au fond du tube, pendant un temps variant de zéro à cent vingt minutes.

Nous avons utilisé les colorants acides suivants, appartenant aux groupes chimiques les plus divers :

Vert lumière, fluorescéine, Jaune de métanyl, Bleu trypan, Rouge Congo.

Les souches testées étaient les suivantes :

Mycobacterium tuberculosis H37 Rv,

Mycobacterium tuberculosis souche Brévannes,

BCG,

Mycobacterium minetti,

Mycobacterium phlei (Fléole).

(*) Travail subventionné par l'I. N. H. (professeur BUGNARD) et la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1955.

TABLEAU I. — Zone acide, pH = 1,2.

TEMPS (1)	VERT LUMIÈRE	FLUORESCÉINE (2)	JAUNE DE MÉTANYL	BLEU TYPAN	ROUGE CONGO
<i>H37 Rv ou BREVANNES</i>					
0 . .	Jaunepâle	Jaune pâle.	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle
5 . .	—	—	—	—	Jaune
10 . .	Jaune verdâtre	—	—	Jaune bleuté	Bleuté
30 . .	Jaune vert	—	—	Bleuté	Bleu
60 . .	—	—	—	Bleu	—
120 . .	Jaune	—	—	Bleu léger	—
<i>BCG</i>					
0 . .	Jaune blanc	Jaune blanc	Jaune blanc	Jaune blanc	Jaune blanc
5 . .	Mélangé	—	Mélangé	—	—
10 . .	—	—	Jaune léger	—	—
30 . .	Verdâtre	—	Jaune	—	—
60 . .	—	—	—	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
<i>Minetti</i>					
0 . .	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle
5 . .	—	—	—	—	Pté. gris
10 . .	—	—	—	Bleuté	Germes non colorés.
30 . .	Vert pâle	—	—	Bleu pâle	—
60 . .	—	—	Jaune	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
<i>Para-tuberculeux (Fléole)</i>					
0 . .	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre
5 . .	—	—	—	—	—
10 . .	Verdâtre	—	—	—	—
30 . .	—	—	—	—	—
60 . .	Lég. vert	—	—	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
(1) Couleur du culot au bout d'un temps exprimé en minutes.					
(2) Avec la fluorescéine, quel que soit le pH, il ne semble pas qu'il y ait de modification de la teinte des germes, difficile à apprécier en raison de la fluorescence du milieu.					

Les tableaux ci-joints résument nos observations.

On peut conclure de ces résultats que, dans l'ensemble, les colorants acides sont peu ou mal fixés sur tous les *Mycobacterium* examinés ici, quelle que soit leur catégorie : virulents (après passage à l'animal), atténués (type BCG), peu virulents (paratuberculeux ou saprophytes), quel que soit le pH.

Un fait est remarquable : la coloration après fixation est pâle, toujours inférieure aux intensités obtenues avec les colorants basiques dans des conditions expérimentales semblables.

TABLEAU II. — Zone neutre, pH = 7,2.

TEMPS (1)	VERT LUMIÈRE	FLUORESCÉINE	JAUNE DE MÉTANYL	BLEU TRYPAN	ROUGE CONGO
<i>H37 Rv et BREVANNES</i>					
0 . .	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle
5 . .	—	—	—	—	Orangé lég.
10 . .	—	—	—	—	—
30 . .	—	—	Jaune moyen	—	—
60 . .	—	—	—	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
<i>BCG</i>					
0 . .	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune
5 . .	Mélangé verdâtre	—	—	Jaune blanc	—
10 . .	—	—	—	—	—
30 . .	—	—	Jaune pâle	—	—
60 . .	—	—	—	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
<i>Minetti</i>					
0 . .	Jaune blanc	Jaune blanc	Jaune blanc	Jaune blanc	Jaune blanc
5 . .	—	—	Jaune	Bleuté	Orangé lég.
10 . .	Vert léger	—	—	—	Orangé
30 . .	Vert pâle	—	Jaune plus foncé	Bleu léger	—
60 . .	—	—	Jaune intense	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
<i>Para-tuberculeux (Fléole).</i>					
0 . .	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre
5 . .	Ocre	—	Ocre	Ocre	Ocre
10 . .	—	—	—	—	—
30 . .	Lég. vert	—	—	Lég. bleuté	—
60 . .	Verdâtre	—	—	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
(1) Couleur du culot au bout d'un temps exprimé en minutes.					

On peut dire que la coloration « la moins mauvaise » se produit *en milieu acide*.

Tout au plus peut-on noter que le rouge Congo, au bout d'un temps de latence non négligeable (trente minutes environ), finit par teinter les germes ; mais suivant la couleur même qu'il présente au pH considéré, sans aucun phénomène de métachromasie (bleuté en milieu acide, ocre en milieu neutre ou alcalin). On note peu de différence suivant le caractère des germes.

Un phénomène semblable est retrouvé à un degré plus faible avec le bleu trypan, ou à un degré encore inférieur avec le vert

TABLEAU III. — Zone alcaline, pH = 11.

TEMPS (1)	VERT LUMIÈRE	FLUORESCÉINE	JAUNE DE MÉTANYL	BLEU TRYPAN	ROUGE CONGO
<i>H37 Rv et BREVANNES</i>					
0 . .	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Jaune pâle
5 . .	—	—	—	—	Ocre léger
10 . .	—	—	—	—	Orangé
30 . .	—	—	Jaune moyen	—	—
60 . .	—	—	—	—	Rouge orangé
120 . .	—	—	—	—	Orange pâle
<i>BCG</i>					
0 . .	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune
5 . .	—	—	Jaune pâle	—	—
10 . .	—	—	—	—	—
30 . .	—	—	—	—	—
60 . .	—	—	—	—	Orangé léger
120 . .	—	—	—	—	—
<i>Minetti.</i>					
0 . .	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc	Blanc
5 . .	—	—	Incolore	—	Orangé lég.
10 . .	—	—	Jaune pâle	Lég. bleuté	Orangé
30 . .	—	—	Jaune vert	Bleu pâle	—
60 . .	—	—	Jaune pâle	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
<i>Para-tuberculeux (Fléole).</i>					
0 . .	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune ocre	Jaune-ocre
5 . .	—	—	—	—	—
10 . .	—	—	—	—	Orangé
30 . .	—	—	—	—	—
60 . .	—	—	—	—	—
120 . .	—	—	—	—	—
(1) Couleur du culot au bout d'un temps exprimé en minutes.					

de méthyl (lequel, par exemple, conduit à une coloration lente, guère visible avant soixante minutes, mais surtout nette en milieu acide).

De toutes façons, quel que soit le pH, au bout d'un temps très long (nous avons fait des lectures au bout de douze et même vingt-quatre heures), les germes sont, ou bien non colorés (ils gardent leur teinte originelle : blanc ou jaune, sauf Fléole, bien entendu, qui est ocre), ou faiblement teintés.

L'intensité de couleur obtenue, même dans les cas les plus

favorables, n'est en rien comparable avec ce que nous avons observé avec les colorants de l'autre série [2] basique.

Ces résultats sont obtenus dans trois zones de pH très tranchées. Nous nous proposons de continuer ce travail en opérant dans des zones de pH beaucoup plus étroites, de façon à obtenir des résultats plus nuancés.

On ne trouve que peu de références dans la littérature sur le comportement des Mycobactéries, vis-à-vis des colorants acides. Cependant nos résultats sont en accord avec ceux d'un auteur japonais, Makoto Kaneko [3], du Collège Médical de Nagasaki, qui trouve que certaines Mycobactéries (*Mycobacterium avium*) ne sont pas colorées avec les colorants acides, qu'ils soient vivants ou morts (expérience menée avec 15 colorants de 7 groupements chimiques différents), en suspension de 20 mg de germes dans 1 cm³ d'eau distillée, addition de colorant à 0,01 p. 100, mise en contact, deux heures, à 37°.

L'auteur note que les colorants de la série du triphénylméthane colorent facilement les cellules bactériennes vivantes.

Les bacilles Gram positifs (vivants ou morts) ne sont pas colorés avec les colorants acides. Ceux Gram négatifs sont colorés par ces colorants acides, s'ils sont vivants, mais ne le sont pas, s'ils sont tués.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DESBORDES et Et. FOURNIER. Ces *Annales*, 1954, **86**, 657.
- [2] J. DESBORDES, Et. FOURNIER et Denise ALIX. Ces *Annales*, 1955, **88**, 120 et 240.
- [3] M. KANEKO. *Nisshin Igaka*, 1950, **37**, 144.

ÉTUDE GÉNÉTIQUE D'UN BACTÉRIOPHAGE TEMPÉRÉ D'*ESCHERICHIA COLI*

III. — EFFET DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET SUR LA RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE

par F. JACOB et E.-L. WOLLMAN (*).

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne)

Introduction.

Au cours de l'étude de la recombinaison génétique du bactériophage λ , il est apparu que les fréquences de recombinaison observées différaient suivant la technique de croisement utilisée. Les croisements peuvent être réalisés, soit en surinfectant par un type donné de bactériophage λ des bactéries lysogènes pour un autre type préalablement induites par le rayonnement ultraviolet, soit en infectant simultanément des bactéries sensibles par les deux types de bactériophages λ considérés. On constate ainsi que, pour une même paire de caractères, la fréquence de recombinaison est de trois à cinq fois plus élevée après surinfection des bactéries lysogènes induites qu'après infection de bactéries sensibles. L'accroissement de la fréquence de recombinaison peut être également obtenu en irradiant les bactériophages à croiser, avant leur adsorption sur les bactéries sensibles, ou en exposant à la lumière ultraviolette les complexes formés par l'adsorption des bactériophages sur les bactéries sensibles.

L'objet du présent mémoire est de décrire cet effet du rayonnement ultraviolet sur la recombinaison génétique du bactériophage λ , d'en analyser les modalités et, à la lumière des renseignements ainsi obtenus, de discuter le mécanisme de la recombinaison génétique des bactériophages.

Matériel et techniques.

Les différents mutants du bactériophage λ , les techniques de croisement et les résultats qu'elles fournissent, ont été déjà décrits [1, 2].

(*) Manuscrit reçu le 25 février 1955.

Nous nous bornerons à mentionner ici les nouveaux caractères génétiques utilisés et les quelques modifications apportées aux techniques.

SOUCHES BACTÉRIENNES ET TYPES DE BACTÉRIOPHAGES. — Outre la souche sensible 112 d'*E. coli* K12, nous avons également utilisé la souche C600 que nous devons à l'obligeance de M. J. Weigle. Les plages formées par le bactériophage λ sur ces bactéries sont plus grandes que sur les bactéries sensibles 112 et leur homogénéité peut être encore augmentée si les bactéries indicatrices ont été soumises, avant leur étalement sur gélose, à de petites doses de rayonnement U. V., doses qui laissent de l'ordre de 60 p. 100 bactéries survivantes [3].

Les caractères du bactériophage λ utilisés dans les croisements ont déjà été décrits [4, 2]. Dans les croisements entre phages différant par trois caractères, nous avons eu recours à un caractère nouveau, le caractère m^i décrit par A. D. Kaiser, qui est très voisin ou allélique du caractère p_4 (fig. 1). Dans les croisements entre phages différant

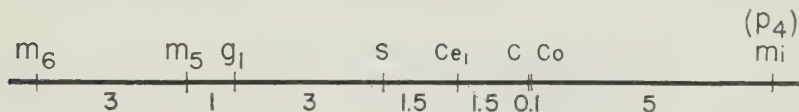


FIG. 1. — Le groupe de liaison du bactériophage λ . — Les nombres représentent la fréquence de recombinaison observée au cours de croisements entre phages différant par deux caractères.

par les trois caractères m_5 , c et m_i , il est possible de distinguer, outre les deux types parentaux, les six types recombinants (planche I).

TECHNIQUES. — Tous les croisements décrits dans ce mémoire ont été faits par infection des bactéries sensibles par les bactériophages à croiser. L'infection simultanée était réalisée par l'addition des bactériophages à des bactéries non proliférantes dont la croissance avait été bloquée par le cyanure de potassium M/250 ou qui avaient été carencées par un séjour d'une heure en sulfate de magnésium M/100 [3].

L'irradiation des bactériophages ou des complexes était réalisée avec une lampe Philips germicide donnant approximativement, dans les conditions de nos expériences, une énergie de 500 ergs $\text{mm}^{-2}\text{min}^{-1}$ pour la longueur d'onde 2537 Å. Avec ce dispositif, la dose optimale pour les bactéries lysogènes K12 (λ), qui correspond à une irradiation de quatre-vingts secondes (dose optimale), laisse survivre environ 40 p. 100 des particules lorsqu'elle est appliquée au phage libre. Appliquée aux bactéries sensibles, ou aux complexes phages-bactéries, elle permet encore la formation de 100 p. 100 de centres infectieux [4]. Cette dose, enfin, ne modifie que légèrement aussi bien le rendement moyen que la durée de la période latente.

L'illumination était réalisée avec une lampe Philips de 500 watts à enveloppe de verre refroidie par une circulation d'eau. Les échantillons à illuminer étaient placés dans un bain-marie à une distance de 20 cm de la lampe.

Résultats expérimentaux.

I. — EFFET DU RAYONNEMENT U. V.
SUR LA FRÉQUENCE DE RECOMBINAISON.

Dans un croisement entre bactériophages, l'irradiation par la lumière ultraviolette, soit des bactériophages eux-mêmes *avant* l'infection, soit du complexe formé *après* l'infection, entraîne un accroissement appréciable de la fréquence de recombinaison observée. Dans la suite de cet exposé, nous appellerons *fréquence de recombinaison* l'expression $r = (\text{somme des recombinants} / \text{somme des parents et des recombinants})$. Les résultats de croisements entre deux bactériophages λ différant par les caractères g_1 et c sont représentés sur le tableau I. La dose de rayonnement U. V. auquel étaient soumis, tantôt les bactéries, tantôt les phages, tantôt les complexes, était dans chaque cas la même et correspondait à la dose *optimale*.

TABLEAU I. — Fréquence de recombinaison entre les phages g_1c et $g_1^+c^+$ après irradiation, soit des bactéries, soit des bactériophages, soit des complexes.

	Types parentaux		Types recombinants		% de recombinants
	g_1c	$g_1^+c^+$	g_1c^+	g_1^+c	
K12($\lambda g_1^+c^+$) induit, puis surinfecté par λg_1c	661	738	139	116	15,7
K12S infecté par $\lambda g_1^+c^+$ et λg_1c	882	774	51	46	5,5
K12S irradié, infecté par $\lambda g_1^+c^+$ et λg_1c non irradiés	910	992	57	62	5,9
K12S non irradié, infecté par $\lambda g_1^+c^+$ et λg_1c irradiés	802	715	314	337	30
K12S non irradié infecté par $\lambda g_1^+c^+$ irradié et λg_1c non irradié	782	697	119	133	14,6
K12S irradié infecté par $\lambda g_1^+c^+$ et λg_1c irradiés	841	769	327	352	29,2
K12S infecté par $\lambda g_1^+c^+$ et λg_1c , puis irradiation du complexe à $t = 0$ min.	894	809	474	439	34,6

Toutes les irradiations sont effectuées avec une même dose de rayonnement U. V. (80 secondes) correspondant à la dose optimale pour l'induction des bactéries lysogènes K12 (λ).

On voit, sur le tableau I, que dans un croisement réalisé par infection simultanée des bactéries sensibles, l'irradiation préalable de celles-ci est sans effet sur la fréquence de recombinaison. Au contraire, l'irradiation du mélange des bactériophages à croiser accroît cette fréquence d'un facteur 5 environ, et l'irradiation du complexe s'accompagne d'un effet comparable. Lorsqu'un seul des parents est irradié, l'accroissement de la fré-

quence de recombinaison est environ moitié moindre. C'est un effet du même ordre de grandeur que l'on observe lorsque le croisement est réalisé par surinfection avec l'un des types parentaux, de bactéries lysogènes pour l'autre type, préalablement induites par le rayonnement ultraviolet.

Contrairement à la lumière ultraviolette, le rayonnement X

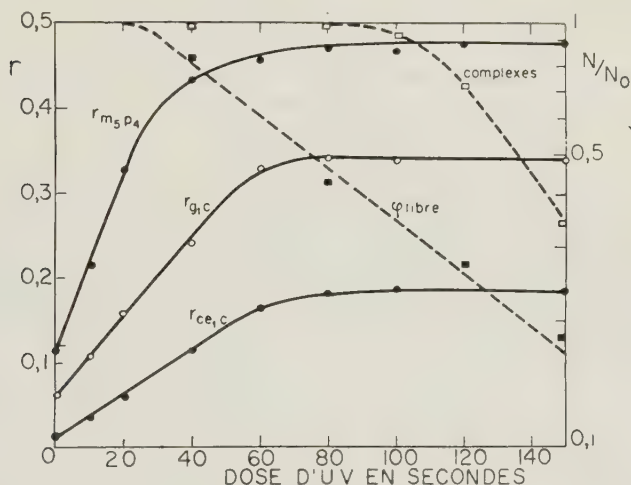


FIG. 2. — Action de la dose de rayonnement U. V. sur la fréquence de recombinaison entre différentes paires de caractères. — Des bactéries sensibles sont infectées, en présence de KCN, avec des proportions égales de deux types de phages différant par deux caractères (multiplicité moyenne : 10 à 15 de chaque type par bactérie). Après vingt minutes d'adsorption, les suspensions sont diluées en tampon froid (temps 0) et exposées immédiatement à des doses croissantes de rayonnement U. V. Après dilution en sérum anti- λ , les suspensions sont maintenues à 37° en milieu nutritif pendant deux heures et les phages libérés sont étalés sur gélose en présence de bactéries indicatrices. En abscisse, la dose d'U. V. en secondes. En ordonnées, les fréquences de recombinaison r observées au cours des croisements $m_5p_4^+ \times m_5^+p_4$, $g_1c \times g_1^+c^+$ et $ce_1^+c \times ce_1c^+$.

(0,9 Å), aux doses inductrices pour les bactéries lysogènes, est sans effet appréciable sur la fréquence de recombinaison.

EFFET DE L'IRRADIATION EN FONCTION DE LA DOSE. — La fréquence de recombinaison entre les deux facteurs g_1 et c a été mesurée en fonction de la dose de lumière U. V. appliquée, au temps 0 après l'infection, aux complexes phages-bactéries. On voit sur la figure 2 que, pour les doses faibles, la fréquence de recombinaison augmente linéairement en fonction de la dose, puis atteint un palier à une dose inférieure à la dose optimale.

La même expérience a été réalisée avec d'autres caractères que g_1 et c , d'une part avec des caractères plus liés, tels que ce_1 et c , d'autre part avec des caractères moins liés, tels que m_5 et p_4 . Les résultats de ces expériences, également représentés sur la figure 2, indiquent que, pour les différentes paires de caractères étudiés, l'effet du rayonnement U. V. est, pour les doses faibles, une fonction linéaire de la dose, la pente étant d'autant plus forte que les caractères sont moins liés. Pour les doses très faibles, la fréquence de recombinaison est augmentée d'un facteur à peu près constant, quelle que soit la paire de caractères considérés. Pour les doses plus élevées, les différentes courbes atteignent un plateau dont le niveau est d'autant plus élevé que les caractères sont plus distants. C'est ainsi que pour les caractères peu liés, tels que m_5 et p_4 , ce plateau atteint un niveau voisin de 50 p. 100, c'est-à-dire proche de l'équilibre génétique. Il est remarquable que les paliers atteints le soient tous sensiblement pour la même dose, ce qui indique l'existence, pour cette dose, d'un phénomène de saturation de l'effet du rayonnement U. V.

On observe également une augmentation de la proportion des particules « hétérozygotes » en fonction de la dose de rayonnement U. V. Dans les croisements mettant en jeu les caractères c et c^+ , où les particules hétérozygotes peuvent être distinguées grâce à l'aspect tacheté des plages qu'elles forment sur les bactéries indicatrices, on constate que la proportion de ces particules qui est d'environ 1 p. 1 000 dans les croisements témoins non irradiés, s'élève aux environs de 1 p. 100 après exposition à la dose optimale de rayonnement U. V.

EFFET DE L'IRRADIATION EN FONCTION DU TEMPS. — Des bactéries, simultanément infectées par les bactériophages g_1c et $g_1^+c^+$, ont été exposées à la *dose optimale* de rayonnement U. V. à des temps variables au cours de la période latente. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur la figure 3 où l'on voit que la fréquence de recombinaison diminue rapidement en fonction du temps écoulé entre l'infection et l'irradiation. Dès la quinzième minute, c'est-à-dire bien avant l'apparition des premières particules infectieuses (vingt-cinquième minute), l'effet de la lumière ultraviolette est déjà trois fois moindre qu'il ne l'était au temps 0.

PHOTORESTAURATION. — On sait que la plupart des effets dus au rayonnement ultraviolet peuvent, pour une large part, être reversés par la lumière visible [5]. C'est également le cas de l'effet étudié ici. Des bactériophages g_1c et $g_1^+c^+$, préalablement soumis à une dose suboptimale de rayonnement ultraviolet, sont simultanément adsorbés sur des bactéries sensibles. Les com-

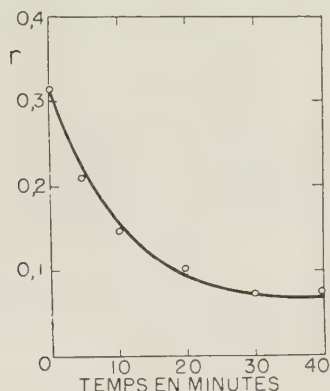


FIG. 3. — Evolution de la fréquence de recombinaison en fonction du temps de l'irradiation au cours de la période latente. — Des bactéries sensibles sont infectées en présence de KCN avec des proportions égales de phages g_1c et $g_1^+c^+$ (multiplicité moyenne 10 à 12 de chaque type). Après vingt minutes d'adsorption, la suspension est diluée en milieu nutritif à 37° (temps 0). A des temps variables de la période latente, des échantillons sont prélevés, dilués en tampon et exposés à une dose optimale de rayonnement U. V. (soixante-quinze secondes). En abscisse, le moment de la période latente auquel les complexes sont exposés au rayonnement U. V. En ordonnée, la fréquence de recombinaison.

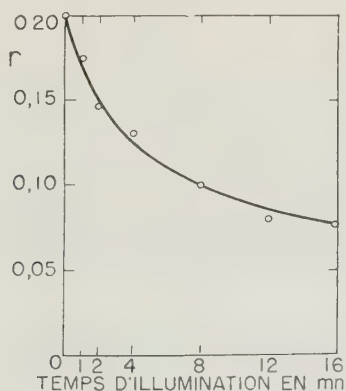


FIG. 4. — Effet de la lumière visible sur la fréquence de recombinaison observée entre bactériophages préalablement exposés au rayonnement U. V. — Des bactéries sensibles sont infectées, en présence de KCN, avec des proportions égales de phages g_1c et $g_1^+c^+$ (multiplicité moyenne : 10 à 12 de chaque type) préalablement exposés au rayonnement U. V. (cinquante secondes). Après dilution en tampon (temps 0), la suspension est maintenue à 27° et exposée à des doses croissantes de lumière visible. Après chaque dose d'illumination, un échantillon est exposé à l'action d'un sérum anti- λ , puis dilué en milieu nutritif à 37°. En abscisse, la dose d'illumination en minutes. En ordonnée, la fréquence de recombinaison.

plexes ainsi formés sont exposés, au temps 0, à des illuminations de durée croissante, et la fréquence de recombinaison entre les marqueurs g_1 et c est mesurée sur chacun des échantillons prélevés. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur la figure 4 où l'on voit que la fréquence de recombinaison, que le rayonnement U. V. avait fait passer de 5 à 20, décroît rapidement en fonction de la durée de l'illumination pour atteindre un niveau à peine supérieur à celui trouvé dans un croisement témoin non irradié.

On peut maintenant suivre, en fonction du temps au cours de la période latente, l'évolution de la *photorestaurabilité* de

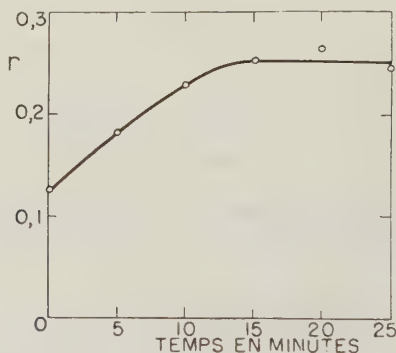


FIG. 5. — Evolution de la photorestaurabilité au cours de la période latente. — Des bactéries sensibles sont infectées en présence de KCN, avec des proportions égales de phages g_1c et $g_1^+c^+$ (multiplicité moyenne : 10 à 12 de chaque type) préalablement exposés au rayonnement U. V. (cinquante secondes). Après dilution en milieu nutritif à 37° (temps 0), des échantillons sont prélevés à des temps variables de la période latente et exposés à une même dose de lumière visible. Après action de sérum anti- λ , les échantillons sont maintenus à 37° dans l'obscurité et étalés. En abscisse, le temps de la période latente auquel a été effectué l'illumination. En ordonnée, la fréquence de recombinaison.

l'effet U. V. Des bactéries simultanément infectées par un mélange de bactériophages g_1c et $g_1^+c^+$ préalablement irradiés par une dose suboptimale d'U. V. sont soumises ensuite, à des temps variables au cours de la période latente, à une même dose de lumière visible. La fréquence de recombinaison entre les caractères g_1 et c est mesurée sur chacun des échantillons prélevés. On voit sur la figure 5, où les résultats de cette expérience sont rapportés, que la photorestaurabilité de l'effet U. V. diminue très rapidement au cours de la période latente. Une illumination constante qui, appliquée au temps 0, réduisait la fréquence de recombinaison de 25 à 12 p. 100, ne produit plus qu'un effet

moitié moindre à cinq minutes et a perdu presque toute efficacité à dix minutes.

L'ensemble des résultats rapportés jusqu'ici indique que l'effet de la lumière ultraviolette sur la fréquence de recombinaison est à la fois fonction de la *dose* du rayonnement, du *temps* auquel cette dose a été appliquée au cours de la période latente et de la *liaison* existant entre les marqueurs considérés. Pour accroître d'une manière appréciable la fréquence de recombinaison, la lésion produite par le rayonnement U. V. doit être précoce. Une fois cette lésion produite, son effet sur la fréquence de recombinaison est peu accessible à une restauration par la lumière visible.

II. — MODE D'ACTION DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET SUR LE MÉCANISME DE LA RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE.

Nous avons, dans un précédent mémoire [2] montré que la théorie de Visconti et Delbrück [6] rend compte des données expérimentales concernant la recombinaison génétique chez le bactériophage λ . Rappelons que cette théorie, qui traite la recombinaison des bactériophages comme un problème de génétique de population, postule qu'au cours de la phase végétative les particules s'apparient au hasard quant au temps et quant au partenaire. Cette théorie, établie pour les gros phages virulents T2 et T4, explique et prévoit un certain nombre de faits retrouvés chez d'autres bactériophages, en particulier l'accroissement de la proportion des recombinants au cours de la période latente et l'interférence négative apparente observée dans les croisements entre phages différant par trois caractères. La théorie de Visconti et Delbrück paraît, en particulier, pouvoir être appliquée au phage tempéré λ pour lequel il a pu être démontré que le nombre moyen de conjugaisons m que chaque particule a subies au cours de la phase végétative est compris entre 0,6 et 0,8 [2, 3].

Nous allons examiner dans quelle mesure sont altérées les principales caractéristiques du schéma de recombinaison génétique du bactériophage après l'action de la lumière ultraviolette.

L'EFFET ULTRAVIOLET EST UN EFFET PRÉCOCE. — Dans le processus normal de la recombinaison génétique, celle-ci est un phénomène relativement tardif. Elle est d'autant plus marquée que la période latente est plus avancée, c'est-à-dire que le nombre de particules végétatives est plus grand et, par conséquent, les chances de rencontres plus élevées. Il n'en est plus de même après l'irradiation.

Une suspension de bactéries simultanément infectées avec des

proportions égales des deux phages à croiser est divisée en deux fractions dont l'une est soumise à la dose optimale de lumière ultraviolette, l'autre conservée comme témoin. A différents temps au cours de la période latente, des échantillons sont prélevés et traités par le cyanure de potassium, qui a pour effet de provoquer une lyse prématurée, et la proportion des recombinants est mesurée dans les divers échantillons. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur le tableau II. On voit que, dans le témoin, la proportion des recombinants fait plus que doubler entre l'apparition des premières particules infectieuses et la fin de la période latente, alors que, dans la suspension irradiée, la fréquence maxima des recombinants est atteinte dès l'apparition des premières particules infectieuses.

TABLEAU II. — Evolution de la fréquence de recombinaison en fonction du temps chez les complexes irradiés et non irradiés.

Addition du KCN à t =	Culture non irradiée		Culture irradiée	
	Nombre moyen de phages mûrs par bactérie	% de recombinants	Nombre moyen de phages mûrs par bactérie	% de recombinants
25 min.	1,7	3,8	0,93	14,2
30 "	4,5	5,6	3,6	13,4
35 "	13,6	6,4	8,9	14,4
40 "	37,7	7,1	27	15,3
45 "	65	7,5	49	13,9
120	131	8,1	121	15,2

Des bactéries sensibles sont infectées en présence de KCN avec des proportions égales de phages $m_{+}^{+}ce_{-}c^{+}$ et $m_{-}ce_{+}^{+}c$. Après vingt minutes d'adsorption, la suspension est diluée en tampon (temps 0). Une fraction est exposée au rayonnement U. V. (dose suboptimale), l'autre est conservée comme témoin. Après action de sérum anti- λ , les deux fractions sont diluées en milieu nutritif à 37°. A des temps variables de la période latente, des échantillons de ces deux fractions sont dilués en bouillon KCN M/200 et après trente minutes à 37°, dilués et étalés sur gélose.

Il semble donc bien, d'une part, que l'irradiation accroisse la fréquence de recombinaison et, d'autre part, que les recombinants soient formés principalement dans la première partie de la période latente. C'est ce que confirme l'examen des productions individuelles de bactéries, simultanément infectées par deux phages différant par trois caractères, et dont une fraction a, dès l'infection, été irradiée et l'autre conservée comme témoin. Les productions individuelles des bactéries non irradiées sont rap-

portées sur le tableau III, celles des bactéries irradiées sur le tableau IV.

De la comparaison de ces deux tableaux, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° La production individuelle moyenne des complexes irradiés n'est que légèrement inférieure à celle des bactéries témoin.

2° Si l'on considère celles des productions individuelles qui contiennent des recombinants pour les caractères ce^+_1 et c^+ , on constate (colonne 7) que la *proportion* des bactéries où de telles recombinaisons se sont produites aussi bien que le *nombre* des recombinants de ce type par bactérie productrice sont beaucoup plus élevés dans la fraction irradiée (tableau IV) que dans la fraction non irradiée (tableau III).

3° On peut, à partir du nombre de tubes qui, dans chaque expérience, ne contiennent pas de recombinants du type $.ce^+_1c^+$, calculer la distribution des recombinaisons efficaces par bactérie, le nombre total d'événements-recombinaison pour la population considérée, et la taille moyenne des clones de recombinants $.ce^+_1c^+$ par événement-recombinaison. On constate que l'irradiation a accru à la fois le nombre moyen d'événements-recombinaison efficaces par bactérie et le nombre moyen de recombinants par événement-recombinaison.

4° Enfin, notons que la proportion des bactéries produisant des recombinants *doubles* $m^+_5ce^+_1c^+$ (colonne 6) aussi bien que la taille des clones de ces recombinants sont beaucoup plus importantes chez les bactéries irradiées que chez les bactéries témoin.

De l'ensemble de ces expériences, on peut donc conclure qu'après l'irradiation, la recombinaison est un événement *relativement précoce*, comme en témoignent la courbe de l'apparition des recombinants au cours de la période latente et la taille des clones de recombinants dans les productions individuelles des bactéries irradiées. La recombinaison est aussi *plus efficace*, ce qui s'exprime par l'accroissement du nombre d'événements-recombinaison par bactérie productrice.

L'EFFET U. V. INTRODUIT UNE POLARITÉ DANS LA RECOMBINAISON.

— La formation précoce de la majeure partie des recombinants montre que, après irradiation par le rayonnement U. V., la cinétique de la recombinaison est différente de celle que l'on observe normalement chez λ ou chez les autres bactériophages étudiés.

Un des faits qui, dans les conditions normales, semble le mieux illustrer le rôle du facteur temps et l'existence de conjugaisons répétées est l'existence dans les croisements entre bactériophages différant par trois caractères, d'un excès de la proportion des recombinants doubles par rapport aux recombinants simples, qui simule une interférence négative. Les recombinants doubles,

TABLEAU III. — Production individuelle de bactéries infectées avec des proportions égales de phages différant par trois caractères [non irradiés] (*).

Nombre total de tubes						: 115
Nombre de tubes contenant du phage						: 25
" " " contenant les deux types parentaux et des recombinants						: 21
1	2	3	4	5	6	7
$m_{5.0}$	$m_5^+ce_1^+$	$m_{5.0}^+$	$m_5ce_1^+$	$m_5ce_1^+c^+$	$m_5^+ce_1^+c^+$	Recombinants $ce_1^+c^+$ (5 + 6)
37	122	2	1	0	0	0
52	63	3	4	0	0	0
47	129	2	3	0	0	0
53	14	23	17	0	0	0
69	83	9	10	0	0	0
64	57	1	1	0	0	0
117	81	5	1	0	0	0
39	48	3	2	0	0	0
68	53	3	1	0	0	0
16	14	1	1	0	0	0
63	8	1	0	0	0	0
53	87	3	1	0	0	0
84	20	2	1	0	0	0
47	63	6	6	1	0	1
53	23	18	21	1	0	1
17	63	2	1	0	1	1
35	29	9	6	1	1	2
53	39	13	17	2	0	2
66	59	7	4	3	0	3
43	39	4	3	2	1	3
31	89	7	6	4	3	7
1107	1183	124	107	14	6	20
Nombre de tubes ne contenant pas de recombinants $ce_1^+c^+$: 13
" " " contenant des recombinants $ce_1^+c^+$: 8
Nombre moyen, par bactérie, des recombinaisons efficaces produisant des recombinants $ce_1^+c^+$ (calculé d'après la distribution de Poisson)						: 0,48
Nombre moyen de recombinants $ce_1^+c^+$ dans les tubes contenant de tels recombinants						: 2,5

Des bactéries sensibles sont infectées avec des proportions égales de phages $m_5^+ce_1^+$ et $m_5ce_1^+c^+$ (multiplicité moyenne, 10 à 12 de chaque type). Après vingt minutes d'adsorption (temps 0), la suspension est diluée en bouillon et distribuée en tubes à raison d'une bactérie pour environ 3 à 4 tubes. Les tubes sont maintenus pendant deux heures à 37° et le contenu de chaque tube est étalé sur gélose avec des bactéries indicatrices.

(*) La corrélation entre recombinants réciproques (colonnes 3 et 4) que l'on peut noter sur ce tableau semble exceptionnelle et n'a été observée que dans cette expérience.

considérés comme provenant de recombinants simples, et résultant de deux événements-recombinaison successifs (dans l'hypothèse la plus simple d'une interférence complète), sont l'expression même

TABLEAU IV. — Production individuelle de bactéries infectées avec des proportions égales de phages différant par trois caractères (irradiés).

Nombre total de tubes						: 118
Nombre de tubes contenant du phage						: 24
" " " contenant les deux types parentaux et des recombinants						: 20
1	2	3	4	5	6	7
$m_5 \cdot c$	$m_5^+ c e_1^+ c^+$	$m_5^+ \cdot c$	$m_5 c e_1^+ c^+$	$m_5 c e_1^+ c^+$	$m_5^+ c e_1^+ c^+$	Récombinants $c e_1^+ c^+$ (5 + 6)
23	14	3	41	0	0	0
27	22	1	0	0	0	0
16	31	8	9	0	0	0
41	32	3	1	1	0	1
23	5	11	21	0	1	2
19	25	34	13	2	0	2
6	47	6	26	1	3	4
26	14	20	3	4	1	5
61	7	3	5	2	3	5
14	32	4	2	1	5	6
23	85	14	12	4	2	6
47	12	25	23	8	0	8
31	23	62	5	3	8	11
26	43	0	43	10	2	12
29	53	16	9	4	11	15
52	47	31	21	16	9	25
18	30	32	24	14	13	27
26	36	15	16	26	6	32
25	29	24	2	13	23	36
15	39	24	22	12	26	38
546	626	336	298	121	113	234
Nombre de tubes ne contenant pas de recombinants $c e_1^+ c^+$: 3
" " " contenant des recombinants $c e_1^+ c^+$: 17
Nombre moyen, par bactérie, des recombinaisons efficaces produisant des recombinants $c e_1^+ c^+$ (calculé d'après la distribution de Poisson)						: 1,9
Nombre moyen de recombinants $c e_1^+ c^+$ dans les tubes contenant de tels recombinants						: 13,8

Même expérience que celle représentée sur le tableau III. Au moment de la dilution à $t = 0$, une fraction de la suspension a été exposée pendant soixante secondes au rayonnement U. V., puis distribuée en tubes. Les deux expériences, représentées sur les tableaux III et IV ont été faites simultanément sur la même suspension.

de l'hétérogénéité de la population phagique quant au nombre de conjugaisons successives subies par chaque particule.

La présence de clones importants du recombinant double dans les productions individuelles du tableau IV semble déjà indiquer que les recombinants doubles, eux aussi, sont formés précocement. Il reste à élucider le mécanisme de leur formation. La question se pose en effet de savoir si, après irradiation, les recombinants doubles sont formés en deux événements successifs, ou si, au contraire, ils sont, dans leur majeure part, le résultat d'un seul événement-recombinaison.

Dans un croisement entre bactériophages différant par trois caractères m_5 , c et m_i , l'évolution des divers types de recom-

TABLEAU V. — Evolution des fréquences de recombinaison entre deux phages différant par trois caractères, en fonction de la dose d'U. V.

Dose d'UV (sec)	$m_5^+cm_i^+$ A B C	$m_5^+c^+m_i^+$ a b c	$m_5^+c^+m_i^+$ A b c	$m_5^+cm_i^+$ a B C	$m_5^+cm_i^+$ A B c	$m_5^+c^+m_i^+$ a b C	$m_5^+cm_i^+$ a B c	$m_5^+c^+m_i^+$ A b C	Σ	r_{aB}^*	r_{bC}^{**}	r_{aBc}^{***}	$r_{aB} \times r_{bC}$
0	963	1296	90	81	33	39	21	12	2535	0,081	0,041	0,013	0,0033
10	879	1170	121	113	49	41	39	30	2442	0,121	0,065	0,028	0,0078
20	912	1131	189	153	84	60	45	33	2607	0,16	0,085	0,03	0,014
40	564	786	204	128	111	75	54	57	1977	0,22	0,15	0,057	0,033
60	504	636	276	195	159	120	89	76	2055	0,31	0,22	0,08	0,068
80	648	774	420	270	282	183	153	126	2856	0,34	0,26	0,098	0,089
100	434	533	264	178	152	93	101	94	1849	0,34	0,24	0,105	0,083

* r_{aB} : (fréquence des recombinants simples entre m_5 et c) + (fréquence des recombinants doubles).

** r_{bC} : (fréquence des recombinants simples entre c et m_i) + (fréquence des recombinants doubles).

*** r_{aBc} : fréquence des recombinants doubles.

Les valeurs de ces fréquences en fonction de la dose d'U V. sont portées sur la figure 6.

Des bactéries sensibles sont infectées, en présence de KCN, avec des proportions égales de phages $m_5c+m_i^+$ et $m_5^+cm_i$. Après vingt minutes d'adsorption, la suspension est diluée en tampon ($t = 0$) et exposée à des doses croissantes de rayonnement U. V. Après action d'un sérum anti- λ et dilution, les échantillons sont maintenus à 37° pendant deux heures, puis étalés sur gélose avec les bactéries indicatrices.

binants a été suivie en fonction de la dose de rayonnement U. V. appliquée aux complexes au temps 0. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur le tableau V et la figure 6. On voit que :

1° Pour les faibles doses de rayonnement, chaque irradiation accroît d'un même facteur les fréquences de recombinaison observées au niveau de la région m_5c (r_{aB}) et de la région cm_i (r_{bC}). Ce résultat montre que le groupe de liaison est maintenu après irradiation, mais que pour deux caractères donnés, la liaison diminue en fonction de la dose d'U. V.

2° Le nombre de recombinants doubles formés est également une fonction sensiblement linéaire de la dose, ce qui a pour conséquence la diminution progressive de l'interférence négative. En outre, aux faibles doses, chaque irradiation accroît la fréquence des recombinaisons doubles (r_{aBc}) d'un facteur comparable à celui qui est observé pour les recombinaisons simples au niveau de chacune des régions m_{5c} et cm_i . Si cette relation linéaire entre la fréquence des recombinants doubles et la dose d'U. V. n'est pas qu'apparente, résultant, par exemple, de la superposition de deux courbes, elle semblerait indiquer qu'après l'irradiation, les recombinants doubles sont, pour leur plus grand nombre, le résultat d'un seul événement-recombinaison. Les différents types

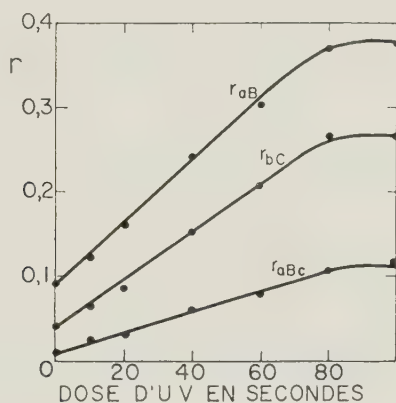


FIG. 6. — Evolution des fréquences de recombinaison entre deux phages différent par trois caractères en fonction de la dose de rayonnement U. V. — Même expérience que celle représentée sur le tableau V. En abscisse, la dose d'U. V. en secondes. En ordonnée, les fréquences de recombinaison ; r_{aB} représente la somme : (fréquence des recombinants simples entre m_5 et c) + (fréquence des recombinants doubles) ; r_{bC} représente la somme : (fréquence des recombinants simples entre c et m_i) + (fréquence des recombinants doubles) ; r_{aBc} représente la fréquence des recombinants doubles.

de recombinants seraient donc, pour leur plus grande part, formés dès le début du développement et, ultérieurement, la recombinaison se poursuivrait au taux réduit que l'on observe avec des particules non irradiées. Les recombinants formés précocement ne conserveraient donc plus le souvenir de la lésion initiale engendrée par l'irradiation.

Des croisements entre deux bactériophages qui diffèrent par trois caractères, mais où les types parentaux se trouvent en proportions très inégales, apportent des renseignements sur la

façon dont sont formés les recombinants doubles. En effet, soient ABC les particules du type parental majoritaire et abc les particules du type parental minoritaire. Si la plus grande fraction des recombinants doubles sont formés en deux événements successifs, le recombinant double de beaucoup le plus fréquent sera le recombinant AbC qui provient de la recombinaison des recombinants simples Abc ou abC avec le parent majoritaire ABC , et qui comprend le *marqueur médian du parent minoritaire*. L'autre recombinant double aBc qui possède le caractère médian du parent majoritaire ne sera qu'exceptionnellement formé par recombinaison des recombinants simples aBC ou ABc avec le parent minoritaire abc ou entre eux. Dans l'hypothèse d'une interférence positive complète et avec un système où il n'existerait aucun avantage sélectif pour aucun des génotypes formés dans un tel croisement, on devrait retrouver dans la descendance les deux recombinants doubles dans la proportion même où l'on aurait

placé les deux types parentaux : $\frac{AbC}{aBc} = \frac{ABC}{abc}$. Si, au contraire,

il existait un grand degré d'interférence négative, c'est-à-dire si la plupart des recombinants doubles étaient formés en un seul événement, le rapport $\frac{AbC}{aBc}$ devrait être proche de 1. Dans le cas

où il n'existerait pas d'interférence, ce qui semble le plus vraisemblable, aussi bien chez les bactériophages virulents du type T2 ou T4 que chez le bactériophage tempéré λ , et où le nombre des cycles de conjugaison est, comme chez λ , petit [2], le rapport $\frac{AbC}{aBc}$

devrait être compris entre la valeur du rapport $\frac{ABC}{abc}$ et 1 et devrait permettre de calculer la fraction des recombinants doubles AbC formés en un seul événement.

Nous avons recherché, dans un croisement de ce type (types parentaux différant par trois caractères et en proportions inégales), comment évoluait le rapport $\frac{AbC}{aBc}$ entre les deux types de recombinants doubles, après irradiation, soit du type majoritaire, soit du type minoritaire, et par comparaison avec un croisement témoin non irradié. Les résultats de ces trois croisements réalisés au cours de la même expérience et où le type majoritaire avait les caractères $m_1^+cm_2$, et le type minoritaire les caractères $m_1^-cm_2^+$ sont rapportés dans le tableau VI.

On voit que dans le croisement sans irradiation, le rapport $\frac{AbC}{aBc}$ prend une valeur intermédiaire entre la valeur 1 que prévoit

TABLEAU VI. — Effet provoqué par l'irradiation de l'un des phages, dans un croisement mettant en jeu des proportions inégales de deux phages différant par trois caractères.

	M $m_5^+cm_1^+$ A B C	m $m_5^+c^+m_1^+$ a b c	$m_5^+c^+m_1^+$ A b c	m_5cm_1 a B C	$m_5^+cm_1$ A B c	$m_5c^+m_1$ a b C	$m_5cm_1^+$ a B c	$m_5^+cm_1^+$ A b C	Σ
1 sans irradiation	11194	873	320	348	117	94	28	91	13065
	Proportion des particules parentales adsorbées $\frac{M}{m} : \frac{22}{3,5} =$								6,3
	Proportion des allèles $\frac{c}{c^+}$ dans la descendance :								8,5
	Proportion des recombinants doubles $\frac{AbC}{aBc}$ dans la descendance :								3,2
2 irradiation du parent majoritaire (M UV)	5783	526	281	349	161	103	64	75	7342
	Proportion des particules parentales (totales) adsorbées $\frac{M \text{ UV}}{m} : \frac{33}{3,5} =$								9,4
	Survie du parent majoritaire M irradié :								0,57
	Proportion des parents survivants adsorbés $\frac{M \text{ UV}}{m} : \frac{33}{3,5} \times 0,57 =$								5,4
	Proportion des allèles $\frac{c}{c^+}$ dans la descendance :								6,5
	Proportion des recombinants doubles $\frac{AbC}{aBc}$ dans la descendance :								1,17
3 irradiation du parent minoritaire (m UV)	3955	261	197	217	106	72	13	111	4932
	Proportion des particules parentales (totales) adsorbées $\frac{M}{m \text{ UV}} : \frac{22}{5,1} =$								4,3
	Survie du parent minoritaire m irradié :								0,59
	Proportion des parents survivants adsorbés $\frac{M}{m \text{ UV}} : \frac{22}{5,1} \times 0,59 =$								7,2
	Proportion des allèles $\frac{c}{c^+}$ dans la descendance :								8,2
	Proportion des recombinants doubles $\frac{AbC}{aBc}$ dans la descendance :								8,1

Des bactéries sont infectées avec des proportions inégales des deux phages $m_5^+cm_1^+$ (M) et $m_5c^+m_1^+$ (m). Expérience 1 : pas d'irradiation. Expérience 2 : irradiation du type majoritaire M. Expérience 3 : irradiation du type minoritaire m. Les trois croisements ont été réalisés simultanément.

l'hypothèse d'une interférence négative et la valeur du rapport $\frac{ABC}{abc}$ entre les types parentaux. L'hypothèse selon laquelle la recombinaison entre bactériophages λ se fait sans interférence et comporte un nombre moyen faible de cycles de conjugaison (entre 0,5 et 0,8) semble donc justifiée. En effet, selon cette hypothèse, une fraction relativement importante des recombinants doubles devrait être produite en un seul événement-recombinaison, ce que confirme l'expérience. Il est malheureusement impossible d'évaluer avec précision la valeur de cette fraction car, d'une part, comme l'indique le tableau VI, les types de bactériophages croisés ne sont pas rigoureusement sans avantage sélectif l'un par rapport à l'autre et, d'autre part, le petit nombre de particules prenant part à la multiplication [2] peut créer une hétérogénéité relativement importante dans la population bactérienne. C'est ainsi que le rapport des types possédant les allèles c et c⁺ qui était de 6,3 au moment de l'infection est de 8,5 dans les particules

TABLEAU VII. — Production de bactéries individuelles infectées avec des proportions inégales de deux phages différant par trois caractères : irradiation du type majoritaire.

Nombre moyen de phages $m_5^+m_1^+$ adsorbés par bactérie	0,29
Nombre moyen de phages $m_5^+cm_1$ irradiés par bactérie	7,9
Fraction des phages $m_5^+cm_1$ survivant à l'irradiation	0,47

Nombre total de tubes	254
Nombre de tubes contenant du phage	119
Nombre de tubes contenant exclusivement le parent majoritaire	96
Nombre de tubes contenant le parent majoritaire et des particules ayant des caractères du parent minoritaire	23

Distribution des caractères issus du parent minoritaire							
Boîte n°	$m_5^+c^+m_1^+$ a b c	$m_5^+c^+m_1^+$ A b c	$m_5^+cm_1$ a B C	$m_5^+cm_1^+$ A B c	$m_5^+c^+m_1$ a b C	$m_5^+cm_1^+$ a B c	$m_5^+c^+m_1$ A b C
1	17	1	0	0	13	0	2
2	14	0	6	3	0	3	0
3	41	12	1	1	2	0	3
4	9	16	0	0	0	0	3
5	53	27	0	0	2	0	3
6	47	0	9	11	2	0	6
7	13	5	2	1	11	3	0
8	41	17	5	2	14	0	9
9	77	11	3	1	12	2	0
10	49	23	3	19	2	9	3
11	29	8	33	16	9	6	1
12	19	1	0	0	2	24	0
13	17	3	18	26	1	33	0
14	16	4	13	6	3	23	2
15	5	0	9	0	0	0	0
16	4	7	12	1	4	0	2
17	2	0	6	1	0	2	0
18	2	5	1	6	3	0	3
19	3	0	15	5	2	1	0
20	2	13	1	0	10	0	12
21	2	11	2	0	2	22	0
22	0	2	12	5	0	0	2
23	0	0	0	0	0	19	0

Production en masse							
$m_5^+cm_1$ A B C	$m_5^+c^+m_1^+$ a b c	$m_5^+c^+m_1^+$ A b c	$m_5^+cm_1$ a B C	$m_5^+cm_1^+$ A B c	$m_5^+c^+m_1$ a b C	$m_5^+cm_1^+$ a B c	$m_5^+c^+m_1$ A b C
4952	462	276	239	196	123	112	51

Des bactéries sensibles sont infectées avec des proportions inégales de phages $m_5^+cm_1$ irradiés (majoritaire) et $m_5^+c^+m_1^+$ non irradiés (minoritaire). Après adsorption et action du sérum antiphage, les bactéries sont diluées et distribuées en tubes à raison d'une bactérie infectée par le type minoritaire pour environ 3 ou 4 tubes. Après deux heures à 37°, le contenu de chaque tube est étalé sur gélose en présence de bactéries indicatrices.

TABLEAU VIII. — Production de bactéries individuelles infectées avec des proportions inégales de deux phages différant par trois caractères : irradiation du type minoritaire.

Nombre moyen de phages $m_5^+m_1^+$ irradiés par bactérie	0,34						
Nombre moyen de phages $m_5^+cm_1$ adsorbés par bactérie	5,2						
Fraction des phages $m_5^+m_1^+$ survivant à l'irradiation	0,64						
<hr/>							
Nombre total de tubes	254						
Nombre de tubes contenant du phage	101						
Nombre de tubes contenant exclusivement le parent majoritaire	75						
Nombre de tubes contenant le parent majoritaire et des particules ayant des caractères du parent minoritaire	26						
<hr/>							
Distribution des caractères issus du parent minoritaire							
Boîte n°	$m_5^+m_1^+$ a b c	$m_5^+m_1^+$ A b c	$m_5^+cm_1$ a B C	$m_5^+cm_1$ A B c	$m_5^+m_1$ a b C	$m_5^+cm_1$ a B c	$m_5^+m_1$ A b C
1	13	0	0	0	0	0	0
2	22	0	0	0	2	0	0
3	13	1	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0
5	11	21	2	0	3	0	1
6	5	3	1	0	1	0	0
7	0	1	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	0	6
9	0	0	5	0	2	0	2
10	0	0	2	8	2	0	1
11	0	33	1	2	0	0	2
12	2	39	9	0	1	0	0
13	2	5	16	0	3	0	1
14	0	4	1	13	0	2	0
15	0	0	9	31	0	0	0
16	0	0	4	1	0	0	11
17	0	1	6	3	0	0	17
18	0	0	1	12	2	0	13
19	1	0	19	0	0	0	16
20	1	1	19	0	0	0	12
21	0	21	0	13	2	0	0
22	3	48	6	29	1	0	3
23	3	31	2	1	2	1	13
24	1	0	17	2	12	0	29
25	1	1	12	0	28	0	41
26	3	77	1	93	0	2	31
<hr/>							
Production en masse							
$m_5^+cm_1$ A B C	$m_5^+m_1^+$ a b c	$m_5^+m_1^+$ A b c	$m_5^+cm_1$ a B C	$m_5^+cm_1$ A B c	$m_5^+m_1$ a b C	$m_5^+cm_1$ a B c	$m_5^+m_1$ A b C
6331	296	242	259	143	104	12	153

Des bactéries sensibles sont infectées avec des proportions inégales de phages $m_5^+cm_1$ non irradiés (majoritaire) et $m_5^+m_1^+$ irradiés (minoritaire). Après adsorption et distribution en tubes à raison d'une bactérie infectée par le type minoritaire pour environ 3 ou 4 tubes. Après deux heures à 37°, le contenu de chaque tube est étalé sur gélose en présence de bactéries indicatrices.

de la descendance. La valeur du rapport des recombinants doubles $\frac{AbC}{aBc}$ n'en est pas moins significativement inférieure.

Lorsque l'un des types parentaux a été préalablement soumis à l'action de la lumière ultraviolette, la valeur du rapport $\frac{AbC}{aBc}$ est considérablement modifiée. Cette valeur *décroit* après irradiation du *parent majoritaire* ; elle *s'accroît* lorsque c'est le *parent minoritaire* qui a été irradié. Il est bien évident qu'il ne peut s'agir dans un cas de la création d'une interférence négative et dans l'autre d'une interférence positive. Dans une autre série d'expériences (tableaux VII et VIII), le rapport $\frac{AbC}{aBc}$ a pris, après irradiation du parent majoritaire, une valeur de 0,45 et après irradiation du parent minoritaire une valeur de 12,7.

L'irradiation de l'un des types parentaux a pour conséquence d'accroître, non seulement en proportion, mais aussi en valeur absolue, les recombinants doubles qui possèdent le caractère médian de ce type. *Tout se passe donc comme si le rayonnement ultraviolet avait introduit une polarité dans le croisement.*

Afin de préciser la signification de ce phénomène de polarisation dans des croisements entre phages irradiés et non irradiés, il convient d'analyser les productions de bactéries individuelles. Des expériences de ce type ont été réalisées d'une part après irradiation du type parental majoritaire, et d'autre part après irradiation du type parental minoritaire. Les résultats d'un croisement où le type majoritaire $m_1^+cm_1$ a été préalablement irradié sont présentés dans le tableau VII.

On voit que dans la production totale, le rapport $\frac{AbC}{aBc}$ est de 0,45, alors que le rapport des allèles parentaux est de 6. Il existe donc un excès considérable de recombinants doubles ayant le caractère médian du parent majoritaire irradié. L'examen des productions individuelles fait ressortir la grande hétérogénéité de celles-ci. Dans la plupart, le parent minoritaire, dont une seule particule a servi à l'infection, a formé un clone assez important. La distribution des recombinants dans les productions individuelles est très variable, mais il existe, dans chaque production, un ou plusieurs clones de recombinants de taille supérieure à 10. Lorsqu'il existe un clone du recombinant double AbC , il existe également des recombinants simples Abc ou abC qui sont susceptibles, par recombinaison avec le parent majoritaire ABC , de lui donner naissance. Les recombinants doubles aBc sont présents en clones plus nombreux que ceux des recombinants doubles AbC . Il semble exclu qu'ils puissent avoir été formés par recombinaison

de recombinants simples aBC ou ABc avec le type parental minoritaire abc , car ils existent même dans les productions individuelles qui ne contiennent pas de clones des uns ou de l'autre.

Dans l'expérience rapportée sur le tableau VIII, c'est le type parental minoritaire $m_3c+m_4^+$ qui a été irradié avant l'infection. Celle-ci, comme dans l'expérience précédente, a été réalisée avec une particule du parent minoritaire irradié pour 3 bactéries.

Dans la production en masse, le rapport $\frac{AbC}{aBc}$ du nombre des recombinants doubles est de 12,7 alors que celui des allèles parentaux est de 8,5. L'examen des productions individuelles montre la grande hétérogénéité de leur composition. On peut constater que dans la grande majorité des tubes contenant des particules qui possèdent certains des caractères du type parental minoritaire, celui-ci est ou absent, ou présent en très petites quantités. Il semble même que les clones de recombinants soient nombreux et importants, surtout dans les tubes où le type parental minoritaire est rare ou absent. Le recombinant double AbC est présent dans plus de la moitié des productions individuelles et le plus souvent sous forme de clones de plus de 10 particules. L'autre recombinant double aBc est le plus souvent absent et lorsqu'il apparaît, il est rare. Un fait remarquable qui ressort de l'examen de ce tableau est la présence, dans un tiers des tubes environ, de plus d'un clone de recombinants de taille supérieure à 10. Ces recombinants possèdent, le plus souvent, le caractère médian du parent minoritaire et un seul des caractères adjacents, dans des combinaisons variables (par exemple a et b , ou ab et b , ou a et ab). Enfin, dans un petit nombre de productions individuelles, l'un des caractères du type parental minoritaire n'apparaît pas dans les particules de la descendance.

De l'ensemble de ces croisements à multiplicités inégales entre bactériophages différant par trois caractères, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° L'irradiation a un effet dépresseur sur le type parental irradié.

2° Elle a pour effet de créer une polarité dans le croisement, polarité qui se manifeste par l'accroissement considérable de la proportion du recombinant double ayant le caractère médian du type parental irradié.

3° Dans les productions individuelles, la présence de clones importants de recombinants simples ou doubles confirme la formation précoce de ces recombinants. Il existe fréquemment, dans la production d'une seule bactérie, plus d'un clone important de recombinants, mais on n'observe aucune corrélation entre types recombinants réciproques.

Les recombinants doubles qui possèdent le caractère médian

du type parental irradié apparaissent dans une proportion importante des productions individuelles sous forme de clones de grande taille. Leur formation précoce semble résulter d'un seul événement-recombinaison car leur présence dans la production d'une bactérie est indépendante de celle des recombinants simples susceptibles de leur avoir donné naissance.

Enfin, les types de recombinants que l'on trouve dans la production d'une même bactérie diffèrent suivant que c'est le parent majoritaire ou le parent minoritaire qui a été irradié. Dans ce dernier cas, en effet, tous les recombinants sont issus d'une seule particule du type minoritaire irradié, alors qu'après irradiation du parent majoritaire, les différents types recombinants proviennent vraisemblablement de plusieurs particules du type majoritaire irradié.

Discussion.

Appliquée soit aux bactériophages à croiser, soit aux complexes bactéries-bactériophages, la lumière ultraviolette a pour effet d'accroître considérablement la fréquence de recombinaison. Cette perturbation du processus de recombinaison est d'autant plus marquée que l'effet primaire du rayonnement, c'est-à-dire la lésion produite, est plus intense (donc la dose plus forte) et plus précoce. La lumière visible, qui restaure presque complètement la lésion initiale, supprime par cela même son effet sur la recombinaison génétique du bactériophage. Une fois cet effet produit, il n'est plus accessible à l'action restauratrice de la lumière visible.

Si la lésion initiale provoquée par le rayonnement doit, pour être efficace, avoir été précoce, son effet sur la recombinaison semble être, lui aussi, précoce. Dans le cas de bactériophages non irradiés, les recombinaisons efficaces sont des événements relativement *rare*s et *tardifs*. La multiplication des particules végétatives précède, dans une large mesure, la recombinaison. Dans le cas des bactériophages irradiés, les recombinaisons efficaces sont des événements relativement *fréquents* et *précoces*. Elles se produisent avant qu'un degré important de multiplication ait eu lieu.

Le schéma proposé par Visconti et Delbrück [6] pour rendre compte de la recombinaison entre deux populations de phages végétatifs en équilibre dynamique permet, comme nous l'avons vu, de rendre compte de la recombinaison du bactériophage λ non irradié [2, 3]. Sous cette forme, il ne semble pas que la théorie de Visconti et Delbrück puisse être applicable à la recombinaison des bactériophages irradiés, en raison de l'hétérogénéité créée par l'irradiation. En effet, d'une part les particules parentales irradiées semblent avoir une viabilité, ou du moins un pouvoir de multiplication, inférieur à celui des recombinants

formés, comme on peut le voir en comparant la dimension des clones formés par le type parental minoritaire irradié et celle des clones formés par les recombinants (tableau VIII). D'autre part, les recombinants formés ont, pour chaque rencontre, une probabilité de se recombiner plus faible que les particules parentales irradiées. La population se compose donc, d'une part des particules parentales qui ont un faible pouvoir de multiplication mais un grand pouvoir de recombinaison et, d'autre part, des particules nouvellement formées qui présentent les caractéristiques inverses.

Le paramètre, qui, dans le schéma de Visconti et Delbrück, est défini comme le nombre moyen de conjugaisons subies au cours de son histoire par chaque particule de la descendance, perd sa signification dans ce système hétérogène et devrait être remplacé par une fonction plus complexe, qui rendrait compte des différents facteurs de cette hétérogénéité.

Le rayonnement modifie donc considérablement les caractéristiques apparentes de la recombinaison. Il est cependant douteux qu'il en modifie le mécanisme même. On peut même se demander si la lésion produite par le rayonnement qui, en quelque sorte, sépare et distingue la multiplication de la recombinaison ne permettrait pas de mieux analyser celle-ci. Quoi qu'il en soit, une analyse du mécanisme de la recombinaison chez les bactériophages irradiés doit être compatible avec un modèle rendant compte de la recombinaison des bactériophages en général.

Les différents modèles ayant pour but une représentation de l'événement-recombinaison chez les bactériophages peuvent, en dernière analyse, se réduire à deux types principaux qui ont déjà été exposés par Hershey et Rotman dans leur étude génétique du bactériophage T2 [7]. Le premier assimile l'événement-recombinaison à un *crossing-over*. Sous sa forme la plus simple, ce modèle implique, d'une part la *disparition des particules parentales* qui prennent part à l'événement-recombinaison et, d'autre part, la *formation de deux recombinants réciproques*.

Le second modèle proposé déjà par Sturtevant [7] et développé depuis par Levinthal [8] peut être appelé recombinaison par *répliques segmentaires*. Il associe réplication et recombinaison, celle-ci se faisant non pas entre particules complètes, mais par juxtaposition de répliques segmentaires complémentaires. Cette interprétation qui explique la formation des particules hétérozygotes rendrait compte, selon Levinthal, de la formation de tous les recombinants. Sous sa forme la plus simple, elle a pour conséquence, dans un événement-recombinaison, la *survie des deux types parentaux et la formation d'un seul recombinant* (ou d'un hétérozygote).

Dans le mémoire précédent, il nous avait semblé que l'analyse

génétique du bactériophage λ et, en particulier, l'examen des productions individuelles de bactéries infectées avec deux types de bactériophages en proportions très inégales excluait la formation des deux types recombinants réciproques et semblaient peu compatibles avec la survie des deux types parentaux.

Avant de discuter le modèle permettant le mieux de rendre compte de la recombinaison des bactériophages après irradiation par de faibles doses de rayonnement U. V., il convient de rappeler les principaux faits mis en lumière par les expériences et les conséquences qu'ils impliquent.

1° *L'efficacité* de la recombinaison, dont témoigne l'accroissement du nombre d'événements-recombinaison, même lorsqu'un seul des types parentaux a été irradié, implique que chaque rencontre entre particules a une probabilité accrue de donner lieu à une recombinaison efficace.

2° La *précocité* de la recombinaison, dont témoignent la proportion des recombinants parmi les premières particules infectieuses formées et la taille des clones de recombinants dans les productions individuelles et par événement-recombinaison, implique que la probabilité pour une rencontre d'être efficace est très grande dès le début de la période latente.

3° Dans un croisement entre types parentaux différant par trois caractères, la *taille des clones de recombinants doubles* observés dans les productions individuelles et l'*évolution du nombre des recombinants doubles en fonction de la dose d'U. V.* indiquent d'une part que les recombinants doubles sont formés en un seul événement-recombinaison et, d'autre part, que les recombinants formés ne conservent pas le souvenir de la lésion initiale.

4° La *polarité* introduite par l'irradiation d'un seul parent montre que l'irradiation détruit la symétrie entre particules parentales, le parent irradié se comportant comme un « donateur » de segments, en particulier de segments médians.

5° L'existence, dans les productions individuelles de bactéries infectées avec plusieurs particules d'un type parental intact et une seule particule du type minoritaire irradié, de *plusieurs clones de recombinants* et la *distribution* des marqueurs du parent minoritaire parmi ces clones sont en faveur de la survie du parent minoritaire. Dans un croisement où c'est le type parental majoritaire qui a été irradié, la présence, dans presque toutes les productions individuelles, de clones importants du type parental minoritaire est également, étant données à la fois l'efficacité et la précocité des événements-recombinaison, en faveur de l'hypothèse de la survie du type parental minoritaire.

Il semble extrêmement difficile, même au prix d'hypothèses complexes, qu'un modèle comportant un *crossing-over* entre bactériophages puisse remplir les conditions qui viennent d'être expri-

mées. Le modèle des répliques segmentaires, au contraire, semble, sans trop de difficultés, pouvoir les satisfaire.

Supposons, avec Levinthal [8], que les phages se multiplient par formation de répliques. Un recombinant sera produit lorsqu'une réplique segmentaire formée sur l'un des parents sera complétée par une réplique segmentaire complémentaire formée sur l'autre parent. Ces répliques pourraient commencer à un endroit quelconque le long d'un « chromosome », car leur début en bout de chaîne aurait pour conséquence une interférence positive complète, ce qui est contraire aux résultats de Bresch [9], à ceux de Kaiser [3] et aux nôtres, qui indiquent qu'une certaine fraction des recombinants doubles, non négligeable dans le cas de T1 comme dans le cas de λ , sont formés en un événement.

Avec les bactériophages non irradiés, une réplique, une fois commencée, progresse assez rapidement à la façon d'une « fermeture éclair » suivant l'expression de Sturtevant [7]. La probabilité pour une particule donnée sera beaucoup plus grande de faire une réplique complète plutôt qu'une réplique segmentaire qui, à la faveur d'une rencontre, sera continuée par une réplique complémentaire formée sur une autre particule. La recombinaison est donc un événement relativement rare et augmente en fonction du temps.

L'effet du rayonnement ultraviolet aux doses utilisées dans nos expériences (qui laissent plus de 50 p. 100 de survivants) serait de produire au hasard des lésions qui, d'une part, pourraient initier la formation des répliques et, d'autre part, ralentiraient leur progression au niveau même de la lésion. Ainsi se trouverait augmentée la durée moyenne de vie des répliques segmentaires et partant, leur probabilité d'être complétées sur des particules non homologues. Ceci permettrait d'expliquer à la fois l'efficacité et la précocité de la recombinaison et aussi, lorsqu'un seul type parental a été irradié, la polarité. La présence de plusieurs clones de recombinants dans les productions individuelles, lorsque seul le parent minoritaire a été irradié, pourrait s'interpréter par la formation, sur ce parent minoritaire, de deux ou trois répliques successives, ce qui rendrait compte également des types de clones recombinants que l'on trouve dans de telles productions.

C'est une interprétation du même ordre que Bresch a adoptée pour rendre compte des résultats obtenus dans l'étude génétique du bactériophage virulent T1, qui, comme le bactériophage tempéré λ , ne présente qu'un petit nombre de cycles de conjugaison [9]. C'est également le modèle qui permet le mieux d'interpréter les cas de réactivation, par recombinaison génétique, de loci provenant de particules inactivées par le rayonnement ultraviolet [10, 11] ou par la désintégration d'atomes de phosphore P^{32} [12]. Une différence existe cependant entre les résultats

de Doermann [41] et les nôtres. Doermann a trouvé une distribution clonale des marqueurs du parent minoritaire, alors que, dans nos expériences, la distribution de ces marqueurs est peu différente de la distribution observée en l'absence de toute irradiation. Cette différence peut aisément être expliquée par la différence entre les doses employées et aussi par la vraisemblable différence de l'importance du « réservoir » (pool) de particules végétatives, chez T4 d'une part, et chez λ d'autre part.

Un dernier point mérite d'être souligné. Le phénomène décrit sous le nom de « réactivation par multiplicité » chez les phages pairs de la série T [43] ne s'observe pas ou peu avec le bactériophage λ . Il peut, à première vue, paraître surprenant qu'un bactériophage chez lequel l'irradiation accroît l'efficacité de recombinaison de façon aussi marquée ne manifeste pas de réactivation par multiplicité. Pour expliquer cette situation paradoxale en apparence, il faudrait admettre, soit que la réactivation par multiplicité ressorte d'un mécanisme « physiologique » et non pas génétique, comme il a été suggéré par Dulbecco [44], soit que les lésions provoquées par le rayonnement U. V., qui, chez les phages virulents, sont restaurables par multiplicité, puissent, dans le cas de λ , être restaurées par les bactéries elles-mêmes.

Il convient de rappeler que, pour interpréter la « réactivation par multiplicité », Luria [45] avait émis l'hypothèse des unités génétiques indépendantes. Le modèle des répliques segmentaires conserve la possibilité d'une réactivation d'unités génétiques [41] tout en assurant le maintien de groupes de liaison entre caractères, maintenant que le modèle du *crossing-over* avait pour but d'expliquer.

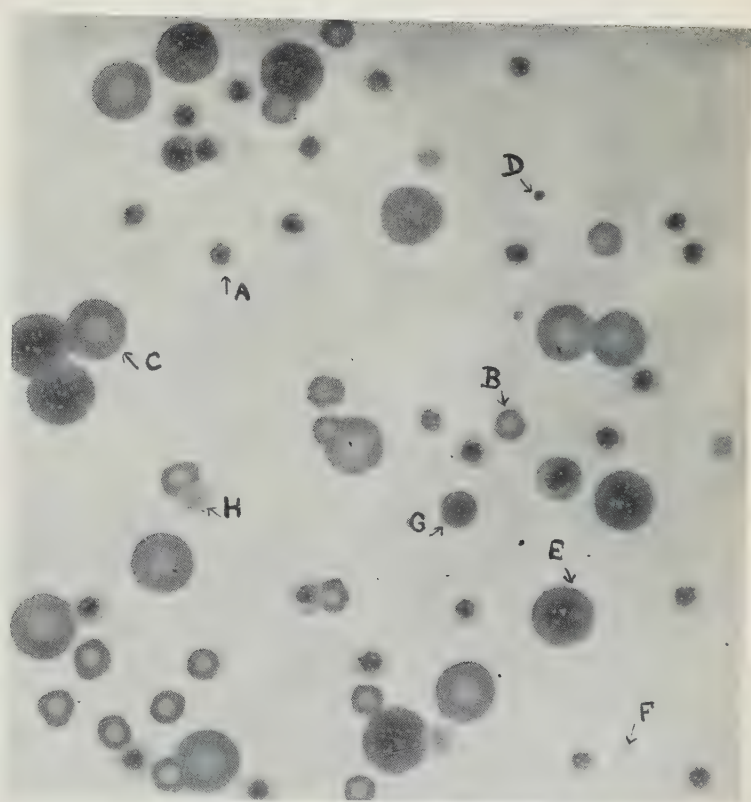
Conclusions.

1° La fréquence de recombinaison entre des bactériophages λ qui diffèrent par deux caractères au moins est accrue par l'exposition à de faibles doses de rayonnement ultraviolet, soit des bactériophages eux-mêmes, soit des complexes phages-bactéries. L'irradiation des bactéries seules ne modifie pas la fréquence de recombinaison.

2° Pour une paire donnée de caractères, la fréquence de recombinaison augmente linéairement avec la dose. La pente de la droite est d'autant plus forte que les caractères étudiés sont moins liés. Une saturation est atteinte pour des doses qui laissent de 30 à 40 p. 100 des bactériophages libres survivants.

3° L'effet du rayonnement U. V. est presque totalement photorestaurable au début de la période latente. Cette photorestaurabilité décroît rapidement en fonction du temps.

4° Le rayonnement ultraviolet accroît à la fois la précocité et l'efficacité de la recombinaison.



Plages formées sur C600 irradié par les phages issus du croisement
 $m_3c+m_i+ \times m_3+cm_i$.

A : m_3+cm_i ; B : m_3c+m_i+ ; C : m_3+c+m_i+ ; D : m_3cm_i ; E : m_3+cm_i+ ;
F : m_3c+m_i ; G : m_3cm_i+ ; H : m_3+c+m_i .

5° Dans les croisements entre bactériophages λ différant par trois caractères, une fraction non négligeable des recombinants doubles est formée en un événement. Après exposition au rayonnement U. V., c'est la grande majorité des recombinants doubles qui sont formés en un seul événement précoce.

6° Dans des croisements mettant en jeu des bactériophages différant par trois caractères, l'irradiation de l'un des types parentaux introduit une polarité dans le croisement. Le recombinant double possédant le caractère médian du type parental irradié est formé beaucoup plus fréquemment que le recombinant double du type opposé.

7° Les différents résultats exposés dans ce travail peuvent être interprétés selon le modèle des répliques segmentaires (partial replicas).

★★

Nous tenons à remercier MM. D. Kaiser et C. Levinthal dont les suggestions et les critiques nous ont été très utiles pour la rédaction de ce travail, ainsi que M^{lles} Y. Nicolas et M. Fiquet pour l'aide apportée à la partie expérimentale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1954, **87**, 653.
- [2] E. L. WOLLMAN et F. JACOB. *Ces Annales*, 1954, **87**, 674.
- [3] A. D. KAISER. En préparation.
- [4] J. J. WEIGLE. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1953, **39**, 628.
- [5] A. KELNER. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 189.
- [6] N. VISCONTI et M. DELBRÜCK. *Genetics*, 1953, **38**, 5.
- [7] A. D. HERSHEY et R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44.
- [8] C. LEVINTHAL. *Genetics*, 1954, **39**, 169.
- [9] C. BRESCH. En préparation.
- [10] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 101.
- [11] A. H. DOERMANN, M. CHASE et F. W. STAHL. *J. Cell.comp. Physiol.*, 1955.
- [12] G. S. STENT. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1953, **39**, 1234.
- [13] S. E. LURIA et R. DULBECCO. *Genetics*, 1949, **34**, 93. .
- [14] R. DULBECCO. *J. Bact.*, 1952, **63**, 199.
- [15] S. E. LURIA. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1947, **33**, 253.

LA LYOPHILISATION DES LEVURES

PREMIÈRE PARTIE

par L. GUIBERT et P. BRÉCHOT (*).
avec la collaboration technique
de L. BENICHO, Mlle M. POTART et R. POIRIER.

(*Institut Pasteur.*
Service des Vaccins et Service des Fermentations)

La faible survie observée dans le passé par quelques auteurs, au cours d'essais de dessiccation de levures après congélation, encourageait peu à utiliser la technique dite de « lyophilisation » [1] dans un but industriel de conservation des levures.

Par contre nous savions qu'une conservation remarquable des caractères antigéniques des bactéries était possible et que la technique de lyophilisation était couramment utilisée pour conserver les souches de nombreux germes pathogènes. Il nous a donc paru utile de reprendre l'étude de la lyophilisation des levures et, en particulier, l'étude des modalités techniques de la lyophilisation permettant d'obtenir la plus haute survie, la conservation des pouvoirs fermentaires et de reproduction des levures du genre *Saccharomyces* devant être d'autant meilleure, nous semblait-il, que le taux de survie après lyophilisation était plus élevé.

Les modalités techniques de la lyophilisation sont multiples. Pour avoir une idée de cette diversité, il suffit de passer en revue quelques-uns des appareillages de lyophilisation proposés par les constructeurs. Dans tel appareil, la congélation est obtenue par évaporation sous vide de la suspension que l'on se propose de dessécher. Dans tel autre, la congélation se fait par projection de jets d'alcool éthylique à -40° sur les flacons entraînés dans un mouvement de rotation sur leur axe, ce mouvement de rotation permettant de fixer la suspension congelée sur les parois du récipient. D'autres auteurs congèlent à -76° ; d'autres encore utilisent l'air liquide et congèlent aux environs de -150° . Au cours de la dessiccation proprement dite, suivant le type d'appareil, le piégeage de l'eau se fait soit en utilisant divers corps avides d'eau, soit à l'aide d'une paroi froide, à -70° environ. Suivant le type d'appareil encore, le vide obtenu est de l'ordre

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} février 1955.

du 1/10 de millimètre de mercure ou bien du 1/100 ; le réchauffement de la paroi du flacon contenant la suspension congelée pourra se faire soit dans l'atmosphère ambiante, soit à l'aide de résistances chauffantes, etc.

Les mémoires de Wickerham et de ses collaborateurs [2, 3] ont montré qu'il était possible de conserver au laboratoire par ce procédé, pendant plusieurs années, des souches de levures appartenant à de nombreux genres (*Debariomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, etc.). Ces auteurs desséchaient une suspension de levures dans du sérum de cheval, celui-ci étant utilisé pour son pouvoir protecteur. La congélation préliminaire de la suspension, répartie dans des tubes à essais, se faisait aux environs de -50°C ; les tubes à essais étaient ensuite maintenus dans un bain à la température de -5° à -6°C (bain de carboglace dans le « méthylcellosolve »), pendant le temps de dessiccation sous vide. Le piège à eau utilisé pendant la sublimation était soit une colonne de sulfate de calcium anhydre, soit une paroi froide, la source froide étant constituée par le mélange alcool-carboglace. Pour ces auteurs, il importait seulement de conserver quelques éléments cellulaires vivants, permettant un nouveau départ de culture, après plusieurs mois.

Par ailleurs, L. Atkin, W. Moses et P. Gray [4], utilisant la technique de lyophilisation des auteurs précédents, constatent le faible taux de survie de la levure de brasserie. Ils sont amenés à émettre l'hypothèse d'une sélection produite au cours de la lyophilisation et constatent que les individus survivants ont des besoins en facteurs de croissance modifiés en ce qui concerne l'acide pantothénique, l'inositol, les vitamines B_1 et B_6 et la biotine. En conclusion, ces auteurs font des réserves sur l'intérêt de la lyophilisation utilisée dans un but de conservation des souches. Au cours de leur étude, Atkin et ses collaborateurs signalent qu'ils ont obtenu de très faibles taux de survie (1 sur 5 000). On est en droit de penser qu'une amélioration importante du taux de survie permettrait de maintenir les caractères physiologiques de la souche, caractères qui subsisteraient d'autant mieux, après la lyophilisation, que ce taux de survie serait plus élevé.

Dans ce travail nous étudierons les facteurs qui interviennent au cours des différents temps de la lyophilisation et nous serons amenés à choisir les modalités techniques qui nous semblent les plus favorables à la survie des levures.

INTRODUCTION.

Au cours de ce travail nous avons utilisé diverses modalités techniques pour effectuer la lyophilisation. En particulier pour

les études : du rôle de la décompression préalable, de la cinétique de la congélation, de la durée du temps de dessiccation, nous avons procédé de la façon suivante.

Nous utilisons une culture de 4 jours, en milieu peptoné, faiblement aéré, ce qui permet une fermentation alcoolique relativement importante.

Le pH du milieu est voisin de 5,5.

Les cellules de levures sont séparées par centrifugation et remises en suspension dans la quantité suffisante de liquide surnageant qui permet d'obtenir une concentration de 4 à 6 milliards de cellules par centimètre cube. 80 cm³ de suspension sont répartis dans des flacons de 1,500 l et un vide partiel est réalisé à l'intérieur des flacons. Ceux-ci sont ensuite maintenus horizontalement et entraînés dans un mouvement de rotation sur leur axe, leur paroi latérale étant immergée dans un bain à — 33°. Cette manœuvre a pour but de fixer sur la paroi du flacon un film de suspension congelée de 1 mm à 1,5 mm d'épaisseur.

La congélation sous vide partiel étant obtenue, les flacons sont immédiatement fixés sur les tétines du lyophiliseur. Pour déterminer le taux de survie, nous avons utilisé la méthode classique de numération sur plaque de milieu gélatiné en boîte de Petri [5, 6].

Dans la première partie de cette étude, comme nous le précisons plus loin, nous avons comparé les valeurs relatives des taux de survie.

I. — INFLUENCE DU TEMPS ET DES CONDITIONS DE LA RÉHYDRATATION DES LEVURES SUR LE TAUX DE SURVIE.

SIGNIFICATION DES TAUX DE SURVIE INDIQUÉS DANS CETTE ÉTUDE.

Nous allons montrer l'influence du temps de la réhydratation sur le taux de survie évalué en milieu gélatiné. Dans un flacon contenant la levure desséchée nous ajoutons la quantité d'eau distillée permettant de reconstituer le volume initial de la suspension de levures qui a été lyophilisée. Après 10 minutes, puis de 2 heures en 2 heures, nous ensemençons 4 séries de 3 boîtes de mout de bière gélatiné non houblonné, avec 1 cm³ des dilutions en solution physiologique à 8,5 p. 1 000 à 10^{−4}, 10^{−5}, 10^{−6}, 10^{−7}, aux 1/10⁴, 1/10⁵, 1/10⁶, 1/10⁷ de la suspension de levures. Les boîtes sont placées dans une étuve à 22° et les colonies sont comptées après 5 jours. Les chiffres qui nous ont permis d'établir le tableau I représentent les moyennes de trois boîtes. Ils doivent être considérés dans leurs rapports entre eux et non comme ayant une valeur absolue exprimant le taux de survie, la levure desséchée que nous avons utilisée datant de 3 mois et l'ensemencement de la levure fraîche dans le même

moment et les mêmes conditions n'ayant évidemment pu être fait.

Dans son étude sur la lyophilisation [7] Fry rappelle que, lorsqu'on fait une estimation de la survie, il faut tenir compte de la présence des amas de cellules qui peuvent causer des erreurs d'interprétation des résultats obtenus. Dans la présente étude nous avons vérifié que la dispersion des cellules était bien identique après quelques minutes et après plusieurs heures de réhydratation. Fry signale également, à propos de la vitalité des organismes survivants, que ceux-ci doivent donner, lorsque la lyophilisation s'est effectuée dans des conditions satisfaisantes, des colonies aussi grandes et se développant aussi vite que les colonies des levures fraîches non desséchées. En conclusion de son étude, il signale que si, le plus souvent, il y a un parallélisme entre la survie aussitôt après la dessiccation et la survie après une longue conservation à l'état desséché, il n'en est pas toujours ainsi. C'est pour éviter une telle cause d'erreur d'interprétation que nous avons utilisé pour notre étude des levures desséchées depuis 3 mois.

TABLEAU I.

Temps de réhydratation	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	n° 7	n° 8	n° 9	n° 10	n° 11
0 h. (2 à 20')	0	10	83	38	109	19	10				
2 h.	82	97	103	159	557	507	510				
4 h.				453	1.443	1.500	1.543				
6 h.				647	1.950	2.000	2.000				
8 h.	1.160	1.160	1.250	463	1.490	2.600	2.310	1.450	550	2.710	4.030
10 h.				630	1.983	2.820	2.027	1.650	550	1.960	4.660
12 h.						2.570		1.800	320	1.730	4.130
14 h.								1.710	480	1.730	4.700
16 h.								1.330	440	2.000	4.260
18 h.								1.450	490	2.450	3.300
20 h.		980	1.280					1.380	550	2.560	3.430

Nous sommes partis de concentrations de levure différentes et avons effectué 3, 4, 6 et 7 ensemencements, pour chacun des échantillons de levures lyophilisés numérotés de 1 à 11. Malgré les chiffres aberrants, on peut suivre nettement l'effet de la prolongation du temps de réhydratation.

Le tableau I montre :

1° L'influence du temps de la réhydratation sur le taux de survie évalué en milieu gélatiné ;

2° Que si on remet la levure desséchée en suspension dans le milieu initial pendant moins de 10 minutes, elle n'est pas

suffisamment réhydratée pour pouvoir donner des colonies sur moût de bière gélatiné.

3° Que le moût de bière gélatiné à 12 p. 100, milieu de culture solide électif des levures, ne permet pas de réhydrater des levures desséchées.

4° Que les chiffres nous permettant d'évaluer la survie sont maximums après 8 heures de réhydratation et que les rapports de ces chiffres après 2 heures et 8 heures de réhydratation pour une même suspension sont sensiblement les mêmes (les flacons 1, 2, 3 contiennent des fractions d'une même suspension ; il en est de même des flacons 4, 5, 6, 7 d'une part et 8, 9, 10, 11 d'autre part).

Cette influence du temps de la réhydratation et du milieu dans lequel s'effectue la réhydratation, sur le taux de survie des levures, permet peut-être d'expliquer la divergence des résultats obtenus par les auteurs qui ont vérifié les taux de survie de divers microorganismes lyophilisés. En particulier, dans le cas du BCG lyophilisé, J. Bretey, van Deinse, M^{lle} Sénéchal [8], R. Mande et A. Huet [9] ont montré que le taux de survie était de 100 p. 100 ; alors que R. Dubos [10] n'avait trouvé que 1 p. 100 000 sur les échantillons qu'il avait examinés, et M. Panisset et B. Marcil, en 1953, que 9 p. 100 [11]. Ces derniers auteurs font les dilutions, dans de la solution physiologique gélatinée à 5 p. 100, après 4 minutes de contact seulement, semble-t-il, avec le milieu de Sauton au 1/4.

Pour évaluer la survie des suspensions de levures lyophilisées, nous comptons simplement les colonies dans le milieu gélatiné ensemencé avec les dilutions des suspensions. Les chiffres que nous obtenons peuvent être considérés comme des valeurs relatives, que nous pouvons comparer, de la survie des levures dans les différentes suspensions. Ces valeurs relatives de la survie permettent de comparer les différentes techniques de lyophilisation utilisées. En appliquant deux techniques de lyophilisation différentes à des fractions d'une même suspension de levures, on obtient des chiffres, exprimant la survie comme nous venons de l'indiquer, très différents, après 2 heures de réhydratation. Lorsque nous comparerons deux techniques de lyophilisation, nous pourrions estimer que la meilleure des deux techniques est celle qui permet d'obtenir après 2 heures de réhydratation le nombre de colonies le plus élevé.

II. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE CONGÉLATION, DU SACCHAROSE ET DE L'ALCOOL SUR L'ASPECT MICROSCOPIQUE DE LA SUSPENSION DE LEVURE CONGELÉE.

Il nous a semblé utile de pouvoir comparer les aspects des suspensions de levures congelées à différentes températures et de

vérifier les modifications de ces aspects que pouvait entraîner l'adjonction de saccharose et d'alcool éthylique à la suspension des levures.

Pour avoir des photomicrographies nettes des suspensions congelées, nous avons procédé de la façon suivante :

Une petite goutte (1/50 à 1/100 de centimètre cube) obtenue avec une pipette à bout effilé est déposée sur une lame de verre et recouverte par une lamelle. La goutte doit être suffisamment petite pour qu'étalée, les phénomènes de capillarité jouant, elle n'atteigne pas les bords de la lamelle. On a alors une couche monocellulaire de suspension de levures. On lute aussitôt la lamelle avec un corps gras. Lame et lamelle sont plongées dans le mélange alcool-carboglace amené à la température choisie, pendant 3 à 4 minutes ; temps suffisant pour que lame et suspension soient amenées à la température du bain. La lame est ensuite placée sur le réfrigérateur, lui-même posé sur la platine du microscope. Les parois du réfrigérateur peuvent être portées à une température beaucoup plus basse que celle de la suspension congelée, aucune modification d'aspect ne se produisant quand on abaisse la température de la suspension congelée. Il n'y a donc aucun inconvénient à déposer la lame supportant la suspension congelée à -20° sur la paroi du réfrigérateur amenée à -75° ; par contre on est assuré de disposer de tout le temps nécessaire pour mettre au point l'image de la suspension congelée que l'on veut photographier.

Le réfrigérateur est constitué par une boîte plate rectangulaire en cuivre (feuille de 0,6 mm d'épaisseur) ayant comme dimensions extérieures $6,5 \times 60 \times 110$ mm ; un trou rond est percé au centre de chacune des deux grandes faces : le trou de la face supérieure, sur laquelle repose la lame que l'on veut examiner, a un diamètre de 2,5 mm ; le trou de la face inférieure a un diamètre de 11 mm. Les deux trous sont réunis par une lame en cuivre qui limite un tronc de cône par où passent les rayons lumineux. Aux deux extrémités de la boîte métallique sont soudés deux réservoirs ($60 \times 60 \times 60$) qui communiquent par l'intermédiaire du conduit plat constitué par la boîte métallique. On remplit les réservoirs avec le mélange alcool-carboglace et il suffit de temps à autre, de mettre dans les réservoirs un morceau de carboglace pour maintenir la température du réfrigérateur à -75° , -80° . Le réfrigérateur est isolé de la platine par une feuille de matière plastique de 5 mm d'épaisseur, afin d'éviter le refroidissement du microscope et le blocage des engrenages. Les photomicrographies en contraste de phase ont été obtenues par M. Manigault, en utilisant un oculaire $\times 6$ et objectif $\times 40$.

Les suspensions congelées ont été préparées dans les conditions suivantes.

Nous utilisons comme milieu de suspension le liquide de culture de levure auquel nous ajoutons 10 g de saccharose pour 100 cm³. Ce milieu contient également 2 à 3 p. 100 d'alcool produit par la levure cultivée en milieu faiblement aéré. Nous préparons 4 lames qui sont plongées dans des bains d'alcool-carboglace maintenus à -18° , -33° , -50° , -72° . Les lames sont déposées sur la face supérieure du réfrigérateur et photographiées en contraste de phase. Nous obtenons ainsi les images 1, 2, 3, 4.

Une deuxième série d'images 5, 6, 7, 8 est obtenue en congelant à -33° des suspensions en eau de touraillon peptonée contenant : (5) 10 p. 100 de saccharose et 2 à 3 p. 100 d'alcool ; (6) 10 p. 100 de saccharose ; (7) 2 à 3 p. 100 d'alcool ; (8) ne contenant ni saccharose, ni alcool.

W. Flosdorf [12] rappelle qu'il est inutile de porter une suspension de microorganismes à des températures extrêmement basses pour obtenir une congélation rapide, la rapidité des transferts calorifiques contrôlant la rapidité du refroidissement et un équipement convenable permettant d'obtenir un refroidissement rapide d'une façon plus économique que l'utilisation des bains à -78° .

La rapidité de la congélation est fonction de deux facteurs : la température du bain réfrigérant, et la conductibilité thermique des parois de l'enceinte contenant la suspension à congeler.

Ces images montrent :

1° Que plus la congélation de la suspension est rapide, plus nombreuses et petites sont les masses congelées que l'on peut observer.

2° Que les cellules des levures restent parfaitement elliptiques dans les suspensions congelées aux températures les plus basses, c'est-à-dire lorsque la congélation s'est effectuée dans le temps le plus court. Par contre, lorsque la congélation s'est effectuée plus lentement, en portant les lames dans un bain à -18° , on observe des déformations nettes du contour des cellules.

3° Que la présence de saccharose, substance considérée comme ayant un effet protecteur, et d'alcool, permet d'obtenir des masses congelées plus nombreuses et plus petites.

4° Que la présence de 10 p. 100 de saccharose permet d'obtenir des masses congelées plus nombreuses et plus petites que celles que l'on obtient en ajoutant 2 à 3 p. 100 d'alcool éthylique à la suspension.

Nous avons essayé de vérifier si les masses observées contenaient des formations cristallines susceptibles de dévier la lumière polarisée. Bien que l'extinction soit complète, nous ne pouvons affirmer que les masses figurées ne contiennent aucune formation cristalline et qu'elles sont à l'état amorphe. D'autre part, nous ne pouvons dire si les déformations des cellules sont dues à un

effet mécanique de compression ou aux phénomènes d'osmose qui se produisent lorsque, aux températures d'eutexie, la glace se forme dans le milieu de la suspension et que la concentration de la solution saline non congelée, se trouvant au contact de la cellule, augmente progressivement avec la formation de la glace. Une étude physique approfondie de ces phénomènes, qui sort du cadre de la présente étude, permettrait probablement de donner une interprétation plus précise des images que nous présentons.

De toutes façons nous verrons dans une étude ultérieure que les meilleurs taux de survie sont obtenus lorsqu'on congèle à des températures de l'ordre de 33° et dans des récipients ayant une bonne conductibilité thermique susceptible de permettre une vitesse de congélation relativement rapide. Il semble donc qu'il puisse y avoir un rapport entre l'aspect des suspensions congelées et la survie.

III. — VITESSE DES ÉCHANGES THERMIQUES A TRAVERS LES PAROIS DES FLACONS DE VERRE ET DES FLACONS MÉTALLIQUES.

INFLUENCE DE LA CONDUCTIBILITÉ THERMIQUE DE LA PAROI SUR LA SURVIE.

Nous avons mesuré à l'aide d'un couple thermo-électrique, les variations de température, en fonction du temps, de la paroi interne d'un flacon en verre jaune de type courant, d'une capacité de 1,500 l, et les variations de température de la paroi interne d'un flacon en tôle d'acier galvanisé de 0,5 mm d'épaisseur, sensiblement de même forme et de même contenance, quand on plonge ces flacons dans un bain de carboglace porté à une température donnée. Pour se rapprocher des conditions de congélation des suspensions de levures, ces flacons maintenus horizontalement étaient entraînés dans un mouvement semi-circulaire de va-et-vient.

Nous avons réalisé le montage classique : double couple cuivre-constantan ; résistance convenable permettant d'obtenir la sensibilité maximum du galvanomètre ; immersion de l'un des deux couples dans la glace fondante, le deuxième couple étant fixé sur la paroi interne du flacon (fixation avec du sparadrap et bon accolement contre la paroi obtenu avec une baguette mince en matière plastique, faisant ressort).

Nous avons fait de nombreuses mesures. Elles nous ont permis d'établir les courbes de la figure 1. Celles-ci nous montrent que les échanges thermiques se font avec une vitesse considérablement plus grande (au bout de 15 secondes dans le rapport 1 à 4 ou 5 suivant la température du bain), à travers les parois de flacons métalliques qu'à travers les flacons de verre, ce qui n'est pas pour surprendre.

Nous avons mesuré les taux de survie d'une même suspension de levure lyophilisée dans des flacons de verre et dans des flacons métalliques, les autres conditions de la lyophilisation étant identiques : dépression précédant la congélation ; température et temps de congélation, etc.

Le tableau II montre que la survie après 2 heures de réhydratation est nettement plus grande lorsque la lyophilisation s'est

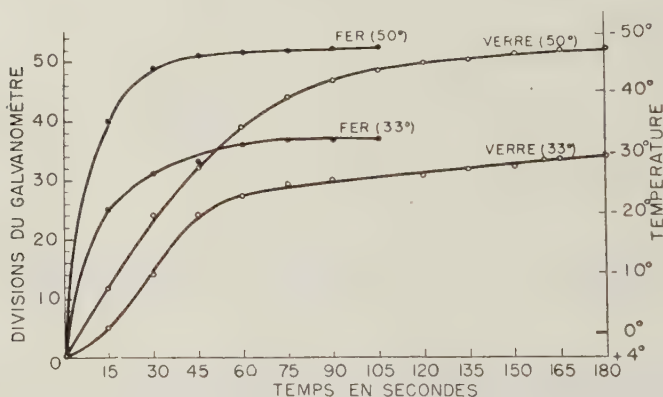


FIG. 4.

effectuée dans les flacons métalliques, c'est-à-dire lorsque la vitesse de la congélation est nettement augmentée.

IV. — ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE AU NIVEAU DE LA FACE INTERNE DU FILM CONGELÉ ET ÉVOLUTION DE LA PRESSION DANS LE FLACON AU COURS DE LA DESSICCATION (1).

La température du film congelé est fonction :

a) De la conductibilité thermique de la paroi du flacon et de la température de l'atmosphère ambiante ;

b) De la vitesse avec laquelle s'effectue la sublimation de l'eau congelée, qui est fonction inverse de la pression à l'intérieur du flacon. Cette pression est elle-même fonction de la pression obtenue par la pompe dans la tête du lyophiliseur, pression qui ne doit pas descendre au-dessous de la pression de vapeur de

(1) Nous adressons tous nos remerciements à M. le professeur Lainé, professeur au Conservatoire des Arts et Métiers, directeur de la Station Expérimentale du Froid, qui a bien voulu nous conseiller dans cette étude.

Nous remercions également M. Pascaud, ingénieur à la Station Expérimentale du Froid, pour l'aide qu'il nous a apportée.

l'eau portée à la température de la paroi froide, sans quoi l'eau passe dans l'huile de la pompe. La température de la paroi froide constituée très rapidement par la couche de glace qui s'est formée sur la paroi du récipient contenant le mélange carboglace-alcool sera fonction de l'épaisseur de cette couche de glace et du débit de vapeur venant se congeler sur la paroi, la congélation de cette vapeur entraînant une élévation de température de la paroi.

TABLEAU II.

	n° 1 (congélation ds un bain à - 33°)	n° 2 (congélation ds un bain à - 33°)	n° 3 (congélation ds un bain à - 23°)
Flacon en verre	45	159	190
Flacon en fer	140	332	301

Les chiffres indiqués représentent les nombres de colonies obtenues après ensemencement, dans des conditions identiques (concentration initiale, dilution), sur moût de bière gélatiné non houblonné.

La survie est doublée lorsque la congélation s'effectue dans un bain à - 33°, augmentée de 50 p. 100 si l'on congèle à 23°.

Rappelons qu'au delà d'une différence de l'ordre de 20° entre la température de la paroi froide et celle du film congelé, il n'y a pas d'amélioration importante de la vitesse de la sublimation si l'on abaisse, même considérablement, la température de la paroi froide ; partant, il n'y a pas de modification très importante de la température du film du fait de l'abaissement même considérable de la température de la paroi froide. La pression à l'intérieur du flacon sera fonction inverse du diamètre et de la longueur du tube reliant le flacon à la tête du lyophiliseur. L'augmentation de la pression dans le flacon, par rapport à la pression dans la tête du lyophiliseur, sera d'autant plus grande que le conduit d'évacuation de la vapeur sublimée sera plus étroit et plus long.

Nous avons effectué les mesures de température au niveau de la face interne du film congelé et les mesures de pression à l'intérieur du flacon où s'effectue la dessiccation en procédant de la façon suivante.

MESURE DE LA TEMPÉRATURE. — Les deux fils du couple thermo-électrique passent par un orifice de la tête du lyophiliseur et par la lumière du tube reliant le flacon à la tête du lyophiliseur. Le couple est fixé sur la face interne du film congelé à l'aide de quelques gouttes de suspension de levures que l'on dépose avec une pipette sur le couple maintenu à l'aide d'une spatule, contre la face interne du film. Ces gouttes sont congelées au contact

du film à -33° et le couple est ainsi fixé sur la paroi interne du film (fig. 2).

Le flacon est maintenu à la température de 33° dans un bain carboglace-alcool pendant tout le temps nécessaire pour fixer le couple. Le col du flacon est ensuite enfoncé dans la lumière du tube en caoutchouc qui le relie à la tête du lyophiliseur.

MESURE DE LA PRESSION. — Un tube de 0,5 mm de diamètre intérieur, dont une extrémité se trouve à l'intérieur du flacon, sort du tube reliant le flacon à la tête du lyophiliseur par un tube

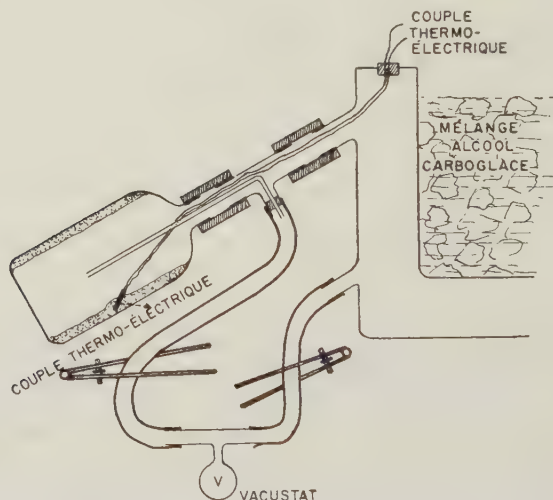


FIG. 2.

métallique en T unissant les deux moitiés du tube en caoutchouc sectionné, qui relie le flacon à la tête du lyophiliseur. La pression dans la tête du lyophiliseur est mesurée avec un vacustat à mercure. La même jauge permet ainsi de mesurer les pressions à l'intérieur du flacon et à l'intérieur de la tête du lyophiliseur : il est vraisemblable que la courbe que l'on pourrait obtenir avec un instrument de mesure permettant une lecture plus facile des pressions indiquées ne comporterait pas des angles aussi nets que ceux de notre courbe ; toutefois l'allure générale de la courbe que nous présentons est significative et il semble que l'on puisse interpréter les courbes de la figure 3 de la façon suivante :

Pendant la 1^{re} heure : variation de la température de -33° (température de congélation) à -23° en 6 minutes ; la pression

à l'intérieur du flacon se maintient à 0,25 mm de Hg ; la pression dans la tête du lyophiliseur est de 0,025 mm de Hg.

Entre 1 heure et 2 h. 1/4, la pression à l'intérieur du flacon tombe brusquement puis se maintient entre 1 h. 1/4 et 2 h. 1/4 ; il semble que la chute de pression puisse correspondre à la dessiccation des couches superficielles et le plateau à la sublimation des couches profondes, plus lente, les interstices séparant les agrégats de la couche superficielle ralentissant la sortie de la vapeur, d'où la chute de pression dans le flacon. La tempé-

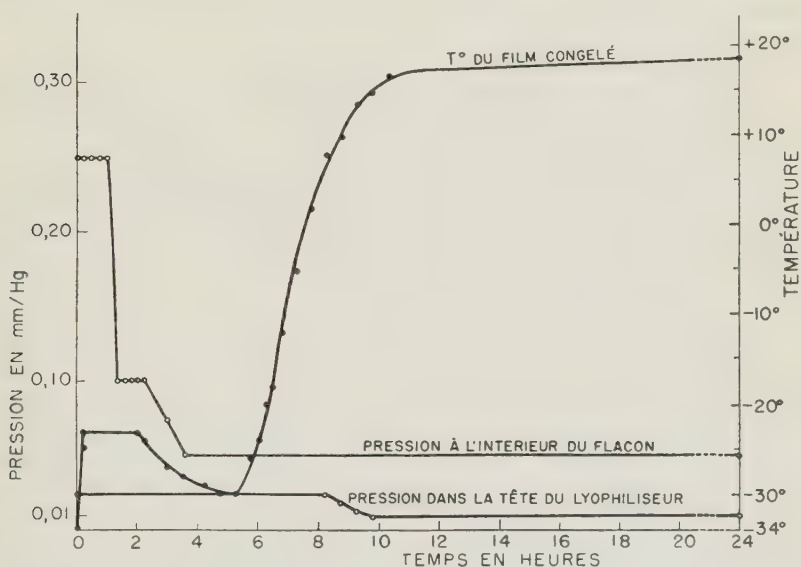


FIG. 3.

rature se maintient jusqu'à 2 heures et ne va commencer à tomber qu'à 2 heures, précédant de peu la chute de pression.

Entre 2 heures et 3 h. 1/2, pression et température sont descendues parallèlement ; la quantité d'eau sublimée dans l'unité de temps va en diminuant : le film a perdu une grande partie de son eau et commence à isoler thermiquement le couple de la paroi du flacon, toutefois il reste suffisamment d'eau dans la suspension partiellement desséchée en contact avec le couple pour que la sublimation de cette eau entraîne un refroidissement l'emportant sur l'apport calorifique qui se fait à travers la paroi du flacon de verre et le film partiellement desséché. L'abaissement de température se poursuit jusqu'à 5 h. 1/4. Puis la température

remonte pendant les 5 heures qui suivent pour atteindre la température extérieure à laquelle elle se maintiendra.

La quantité de vapeur d'eau sortant du flacon par unité de temps va diminuer progressivement et la pression à l'intérieur du flacon devrait continuer à s'abaisser depuis 3 h. 1/2 pour tendre progressivement vers la pression à l'intérieur de la tête du lyophiliseur. Or après 24 heures, cette pression restait égale à la pression observée après quelques heures de dessiccation. Nous n'avons pu déceler la microfuite qui, seule, semble pouvoir expliquer le maintien de cette différence de pression (le diamètre du tube métallique pénétrant à l'intérieur du flacon étant relativement très petit).

La légère chute de pression à l'intérieur de la tête du lyophiliseur entre 8 heures et 9 h. 1/2 peut s'expliquer par l'abaissement de la température de la glace qui s'est fixée sur la paroi froide du piège lorsque l'apport thermique dû à la congélation de la vapeur sublimée diminue, la dessiccation étant en voie d'achèvement. La pompe dont nous disposons, en tenant compte des microfuites que nous n'avons pu supprimer, nous permet d'obtenir une pression de l'ordre de 0,01 mm de mercure à l'intérieur de la tête du lyophiliseur, pression qui reste constante à partir de 9 h. 30. De 0 heure à 9 h. 30 la pression indiquée correspond à la tension de vapeur de l'eau congelée sur la paroi froide. Jusqu'à 8 heures cette tension de vapeur qui est de l'ordre de 0,025 mm de mercure correspond à une température de l'ordre de 50° de la paroi froide. Lorsque la dessiccation est en voie d'achèvement, l'apport thermique dû à la congélation de la vapeur allant en diminuant, la température de la couche de glace va tendre vers la température de la source froide constituée par le mélange carboglace-alcool. La tension de vapeur tendra de ce fait vers 0,0005 mm de mercure et la pression à l'intérieur de la tête du lyophiliseur indiquera les possibilités de la pompe compte tenu des microfuites.

Par contre, la pression indiquée à l'intérieur du flacon ne correspond à la tension de vapeur au niveau de la face interne du film congelé que pendant la 1^{re} heure. La perte de charge après 1 heure est due au freinage de la vapeur qui doit traverser la pellicule desséchée superficielle, et nous ne pouvons avoir d'indication sur la température à laquelle la sublimation se produit que pendant la 1^{re} heure. Cette température est de l'ordre de — 33°.

V. — INFLUENCE DE LA DÉCOMPRESSION PRÉALABLE SUR LA SURVIE DES LEVURES LYOPHILISÉES.

Nous avons constaté qu'en faisant un vide partiel (10 à 15 cm de mercure) dans les flacons contenant la suspension de levures

et en congelant celle-ci sous ce vide partiel, la survie de la levure lyophilisée réhydratée pendant 2 heures était nettement améliorée.

Le tableau III indique les survies obtenues avec et sans décompression préalable.

TABLEAU III. — Influence de la décompression préalable sur la survie.

Flacon de verre

	n°1	n°2	n°3
sans vide	43	86	183
avec vide préalable	45	159	190

Flacon métallique

	n°1	n°2	n°3
sans vide	63	172	165
avec vide préalable	140	332	301

Les chiffres indiqués représentent les nombres de colonies obtenues après ensemencement, dans des conditions identiques (concentration initiale, dilution), sur moût de bière gélatiné non houblonné.

Le départ de la fermentation étant très rapide, il semble que l'on puisse expliquer le rôle de la décompression préalable par l'élimination des gaz et en particulier du gaz carbonique susceptible de modifier les phénomènes de congélation, soit du fait de sa seule présence, soit en diminuant la conductibilité thermique de la suspension, et en favorisant ainsi la formation de masses congelées plus volumineuses.

DISCUSSION.

B. Stille [13], en conclusion de ses recherches sur la mort par le froid des microorganismes, remarque :

Que la congélation lente et la décongélration rapide donnent la plus forte mortalité, tandis que la congélation rapide et la décongélration lente donnent la mortalité la plus faible ;

Que la mortalité se produit sensiblement plus vite à -4° qu'à -15° et à -24° , autrement dit plus basse est la température

jusqu'à -24° , plus lentement meurent les microorganismes, et qu'au delà de -24° on peut atteindre -193° sans accroissement de la mortalité.

Etudiant divers autres facteurs pouvant avoir une influence sur la mortalité, il remarque que la sensibilité au froid du bacille pyocyanique peut être fortement augmentée lorsqu'il est mis en suspension dans des solutions hypertoniques.

T. Nei et T. Ogawa [14], après avoir étudié la survie, le pouvoir fermentaire et l'activité enzymatique de *Sacch. cerevisiae* nécessairement réchauffées après avoir été congelées à de basses températures, observent que, plus rapide est la congélation, plus grands sont les dommages causés à la cellule. T. Nei ne se réfère pas aux travaux de B. Stille.

Avant d'aborder les conclusions des auteurs qui ont étudié l'influence de la vitesse de la congélation sur la survie des microorganismes desséchés après congélation, remarquons à propos des conclusions des deux auteurs que nous venons de citer :

Que B. Stille, qui a étudié l'action du froid sur *Sacch. cerevisiae*, est en désaccord avec T. Nei sur le rôle de la vitesse du refroidissement ;

Que les effets du réchauffement des microorganismes desséchés sont vraisemblablement très différents de ceux que l'on peut observer en l'absence de dessiccation à l'état congelé ;

Qu'au moins en ce qui concerne les effets des congélations lentes, les observations de T. Nei semblent s'opposer à celles des auteurs dont nous allons rappeler les conclusions.

A. U. Smith [15] signale que beaucoup d'organismes et de composés biochimiques ne subissent pas d'altération par la congélation si l'allure du refroidissement est rapide ou ultra-rapide et la température de conservation basse, que les enzymes gardent leur activité et qu'ils peuvent même montrer une activité accrue après congélation rapide à de très basses températures. L'auteur signale également qu'un autre avantage du refroidissement rapide est qu'après la séparation de la glace, les protéides et lipoprotéides subissent pendant un temps moins long l'action des solutions salines concentrées qui n'ont pas atteint leur température eutectique ; et évoquant la sensibilité d'un grand nombre de cellules au choc thermique, précise que les conditions optima de refroidissement qui préservent la viabilité des cellules dépendant de facteurs qui s'opposent, la production du choc thermique doit être évitée, sans toutefois refroidir trop lentement, ce qui prolongerait l'action nocive des solutions salines concentrées, lors de la séparation de la glace, ou permettrait la coagulation et la perte de solubilité des substances colloïdales et toute autre forme de désorganisation cellulaire.

R. I. N. Greaves [16] estime que d'un point de vue théorique

la dessiccation devrait toujours se faire au-dessous du point d'eutexie le plus bas de la solution que l'on lyophilise. En fait il est rarement possible de procéder à la dessiccation dans ces conditions et les résultats que l'on obtient sans qu'elles soient réalisées sont assez satisfaisants pour qu'aucune des méthodes d'investigation dont nous disposons actuellement permette de déceler une dénaturation pouvant se produire au cours de la dessiccation. A ce propos il évoque le phénomène curieux appelé « puffing » par Flosdorff : lorsque certaines solutions sont congelées au-dessus du point d'eutexie le plus bas, elles paraissent solidifiées, mais la présence d'une portion non congelée devient évidente lorsque le bloc congelé est placé dans le vide et qu'à sa surface apparaissent des « bulles ». La présence d'une phase liquide dans la première pénicilline brute congelée à -20° pouvait être démontré en renversant le flacon : un liquide huileux se séparait alors lentement du solide congelé et coulait dans le goulot. C'est par l'étude de la résistivité du bloc congelé, qui devient infime quand la congélation est complète, que l'on peut déterminer la température d'eutexie la plus basse.

R. M. Fry [7] rappelle que nous ne savons rien de l'action protectrice des colloïdes, sinon que quelques-uns protègent mieux que d'autres. L'action des substances cristallines est également obscure et fait poser la question de la détermination de la quantité d'eau résiduelle qui permet à un organisme de survivre à la dessiccation. Nous ne savons pas quel est l'optimum d'eau résiduelle, ni s'il est le même pour tous les organismes. C'est ce qui expliquerait que certains résistent à la dessiccation et que d'autres n'y résistent pas.

Ces conclusions montrent que l'action du froid sur les micro-organismes est encore mal connue, malgré le nombre et l'importance des études qui en ont été faites ; les travaux les plus anciens ayant trait au « choc thermique », évoqués par B. Stille [13], sont ceux de Müller-Thurgau et ont été publiés en 1880.

A. U. Smith [15] remarque que les conditions optima de refroidissement qui préservent la viabilité des cellules dépendent de facteurs qui s'opposent. Au cours de notre étude, nous avons été amenés à déterminer ces conditions de refroidissement en fonction de l'appareillage de dessiccation sous vide dont nous disposions. Cet appareillage nous permettait de maintenir le film congelé, pendant la dessiccation, à -23° . Utilisant, pour congeler la suspension des levures, une source froide à -33° , nous avons amélioré la survie en utilisant des flacons métalliques qui nous permettaient d'augmenter la vitesse de la congélation. Il est vraisemblable que ces températures sont plus élevées que la température d'eutexie la plus basse du milieu de suspension ou du protoplasme cellulaire. Une étude ultérieure nous permettra

de voir s'il est possible d'améliorer encore la survie, en maintenant, avec un appareillage approprié, la température du film congelé pendant la dessiccation très au-dessous de -20° et en augmentant encore la vitesse de congélation en utilisant une source froide maintenue à une température très au-dessous de -33° .

Il semble que l'on puisse dégager de cette discussion la notion suivante : les conditions de la lyophilisation de suspensions de microorganismes sont variables suivant les microorganismes que l'on veut lyophiliser. Les mesures que nous avons faites au cours de cette étude ont pour but de déterminer les conditions de la lyophilisation de *Sacch. cerevisiae* permettant d'obtenir le meilleur taux de survie. Nous avons été amenés à vérifier l'effet, sur la survie, de la vitesse de la congélation qui est fonction de la température du bain dans lequel on plonge le récipient contenant la suspension et de la conductivité thermique des parois du récipient. Dans une étude ultérieure nous vérifierons l'influence de la température du bain sur la survie, une augmentation de la vitesse de la congélation pouvant augmenter la survie et des températures trop basses étant susceptibles de la diminuer. Nous avons mesuré la pression à l'intérieur du flacon où la dessiccation s'effectue, la pression au niveau de la paroi froide du lyophilisateur et la température du film congelé au cours de la dessiccation. La pression à l'intérieur du flacon est l'un des facteurs dont dépend la température du film congelé, les autres facteurs étant la température ambiante, la conductivité thermique de la paroi du flacon et éventuellement de son enveloppe protectrice et enfin, facteur ayant une importance moindre lorsque l'écart de température entre le film congelé et la paroi froide dépasse 20° , la température de la paroi froide.

CONCLUSIONS.

1° Lorsqu'on ajoute une quantité convenable d'eau distillée permettant de reconstituer le milieu initial, à la poudre sèche obtenue après lyophilisation d'une suspension de levures de l'espèce *Sacch. cerevisiae*, et qu'on ensemence du moût de bière gélatiné à 12 p. 100 avec cette suspension reconstituée, la multiplication des cellules de levures ne peut se produire si l'on n'a pas laissé s'écouler un temps suffisamment long entre le moment où l'on a reconstitué le milieu initial par apport d'eau distillée et le moment où l'on ensemence le moût de bière gélatiné. Il semble que l'on puisse parler du temps de réhydratation de la levure permettant d'obtenir une culture en milieu gélatiné et de l'inaptitude d'un tel milieu à permettre cette réhydratation, la gélatine intervenant soit comme un facteur de rétention de l'eau,

soit en perturbant les échanges qui permettent à la cellule de se multiplier.

2° La survie évaluée par le nombre des cellules qui se multiplient en donnant des colonies est très faible ou nulle si l'on ensemence du moût de bière gélatiné à 12 p. 100 avec des levures réhydratées pendant moins de 10 minutes. Le nombre des cellules qui donnent des colonies se développant normalement lorsqu'on ensemence un tel milieu avec des levures lyophilisées est fonction du temps pendant lequel on les a réhydratées. Après 8 heures de réhydratation, le nombre des cellules qui se multiplient n'augmente plus.

3° Deux heures de réhydratation suffisent si l'on veut comparer les survies de deux échantillons de levure lyophilisée, mais un temps de réhydratation de 6 à 8 h. est nécessaire si l'on veut obtenir des taux de survie ayant une valeur absolue, lorsque ces évaluations sont faites en ensemencant du moût de bière gélatiné à 12 p. 100 et lorsque la suspension de levure étudiée contient 10 p. 100 de saccharose ajoutés avant la lyophilisation dans un but de protection.

4° La congélation de suspensions de levure contenant 10 p. 100 de saccharose à -18° provoque la formation de masses congelées de dimensions considérablement plus grandes que celles des masses obtenues en congelant à des températures beaucoup plus basses telles que -33° , -50° , -72° . Les déformations des cellules observées peuvent être dues soit à l'effet mécanique de ces masses comprimant les cellules, soit aux phénomènes d'osmose susceptibles de se produire au cours d'un refroidissement lent ; lorsque la température de la suspension atteint la zone des températures d'eutexie, la glace se forme et la concentration saline de la fraction non congelée du milieu de suspension augmentant, des déformations des cellules qui se déshydratent par osmose peuvent se produire.

5° Une substance protectrice, comme le saccharose, favorise la formation de masses congelées de petite taille.

6° La congélation dans des flacons métalliques permettant des échanges thermiques rapides et favorisant la formation de masses congelées de petite taille permet d'obtenir une survie plus élevée que la congélation dans des flacons de verre, les conditions de la dessiccation à l'état congelé étant identiques.

7° Une décompression lente en 30 minutes à 10 cm de mercure des flacons contenant la suspension de levure devant être lyophilisée, la congélation étant effectuée sous ce vide partiel, permet d'obtenir une augmentation de la survie de la levure lyophilisée.

8° Pour établir les conditions de la lyophilisation permettant d'obtenir la meilleure survie de la levure, il nous semble indispensable de contrôler les effets de divers facteurs susceptibles

d'influencer le taux de survie tels : température du bain dans lequel est plongé le récipient où la congélation s'effectue, vitesse de la congélation qui est fonction de la température du bain et de la conductivité thermique des parois du récipient, température du film congelé au cours de la dessiccation et durée de la dessiccation, pression au niveau de la paroi froide et pression dans le flacon où la dessiccation s'effectue, cette pression étant l'un des facteurs dont dépend la température du film congelé.

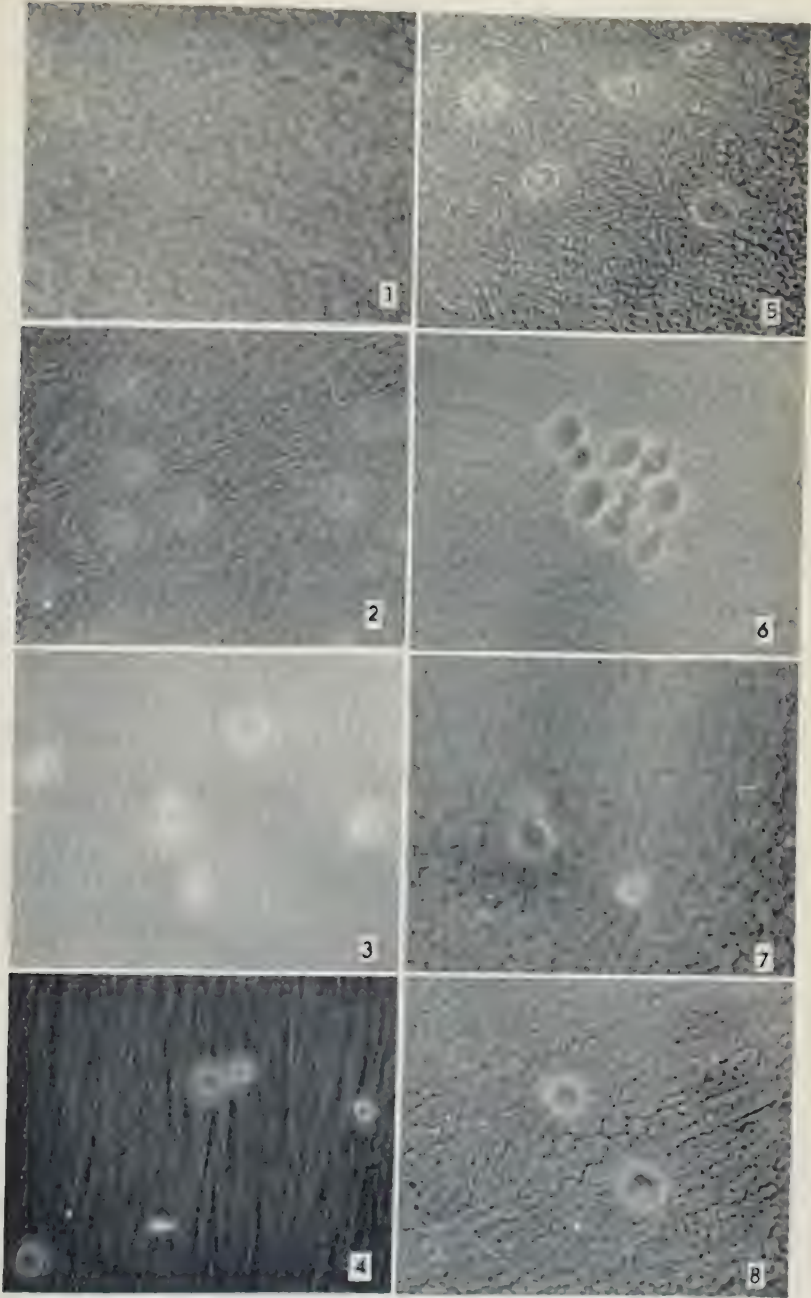
BIBLIOGRAPHIE

- [1] REICHEL (cité par FLOSDORFF et MUDD). *J. Immunol.*, 1935, **29**, 389.
- [2] L. J. WICKERHAM et A. A. ANDREASEN. *Waller's labor. Comm.*, 1942, **5**, 165.
- [3] L. J. WICKERHAM et FLICKINGER. *Brewers digest.*, 1946, **21**, 48 T, 52 T, 58 T.
- [4] L. ATKIN, W. MOSES et P. P. GRAY. *J. Bact.*, 1949, **57**, 575.
- [5] J. R. PORTER. *Bacterial Chemistry and Physiology*. John Wiley and Sons, édit., New York, 1946, 100.
- [6] R. BUTTIAUX. *L'analyse bactériologique des eaux de consommation*. Ed. méd. Flammarion, Paris, 1951, 35.
- [7] R. M. FRY. *The preservation of bacteria. Biological applications of freezing and drying*, ed. by R. J. C. Harris, p. 215. Academic press inc., publishers New-York, 1954.
- [8] J. BRETEY, F. VAN DEINSE et M^{lle} F. SÉNÉCHAL. *1^{er} Congrès International du BCG*, 18-23 juin 1948, 31-32. — F. VAN DEINSE et M^{lle} SÉNÉCHAL. *Freeze dried BCG Tubercle*, 1950, **31**, 157.
- [9] R. MANDE et A. HUET. *Vaccination par le BCG. Trav. et Doc. publiés par le Centre International de l'Enfance*, 1952, n° 3.
- [10] Cité par P. PANISSET et B. MARCIL.
- [11] M. PANISSET et B. MARCIL. *Ces Annales*, 1953, **84**, 841.
- [12] Earl W. FLOSDORF. *Freeze-drying*. Reinhold, édit., New-York, 1949, 20.
- [13] B. STILLE. *Arch. Mikrobiol.*, 1950, **14**, 554.
- [14] T. NEI et T. OGAWA. *J. agr. chem. soc. jap.*, 1954, **28**, 94.
- [15] A. U. SMITH. *Effects of low temperatures on living cells and tissues. Biological applications of freezing and drying*, ed. by R. J. C. Harris, p. 1.
- [16] R. I. N. GREAVES. *Theoretical aspects of drying by vacuum sublimation. Biological applications of freezing and drying*, ed. by R. J. C. Harris, p. 87.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1, 2, 3, 4. — Images de couches monocellulaires de suspensions de levure congelées à -18° , -33° , -50° , -72° .

FIG. 5, 6, 7, 8. — Images de couches monocellulaires de suspensions de levure congelées à -33° , le milieu de suspension contenant : 10 p. 100 de saccharose et 2 à 3 p. 100 d'alcool, 10 p. 100 de saccharose, 2 à 3 p. 100 d'alcool, ni saccharose ni alcool.



**SUR L'INTERFÉRENCE, DANS LA MALADIE
DE NEWCASTLE DE L'EMBRYON DE POULET,
ENTRE LE VIRUS HOMOLOGUE
PRESSÉ, CHAUFFÉ, FORMOLÉ
ET LES LIQUIDES NORMAUX**

par P. ATANASIU, J. BASSET et I. ATANASIU (*)

(Institut Pasteur. Service des Virus)

Le phénomène de l'interférence, dans les maladies à virus, consiste en une modification intracellulaire, probablement enzymatique, produite par un premier virus qui rend incapable un deuxième virus inoculé virulent de se multiplier ; il n'est pas spécifique.

Dans un précédent travail [1], nous avons montré que les deux propriétés du virus de Newcastle, le pouvoir infectant et le pouvoir hémagglutinant, pouvaient être différenciées par la soumission du virus partiellement purifié à une haute pression convenablement choisie (à 4 000 kg/cm², le pouvoir infectant disparaît et le pouvoir hémagglutinant, propriété liée à un enzyme, reste intact).

Nous avons essayé les propriétés d'interférence de ce même virus pressé en fonction du temps et par comparaison avec le virus chauffé ou formolé, en prenant pour témoins les liquides chorio-allantoïdien et amniotique normaux d'œufs de 13 jours [2]. Le phénomène de l'interférence dans la maladie de Newcastle est décelé par la survie de l'embryon ou par la mise en évidence du virus dans les liquides, celui-ci ne pouvant pénétrer dans les cellules. Il a été recherché par F. B. Bang [3] chez l'embryon de poulet et la poule adulte. Chez l'embryon de poulet, le blocage est obtenu avec de fortes doses (0,5 à 1 mg de virus) d'une souche irradiée par les rayons ultra-violets. Chez le poulet, en inoculant une souche avirulente, on produit le blocage du virus virulent. Dans le premier cas, le blocage n'est pas total et la quantité du virus purifié employée est énorme. Dans le deuxième cas, il faut toujours employer une souche virulente ;

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} mars 1955.

l'opération est donc toujours dangereuse du point de vue pratique.

Nous nous proposons, dans ce travail, d'essayer de provoquer le phénomène d'interférence avec un virus partiellement purifié et pressé à 4 000 kg/cm².

Le virus pressé interférent sera inoculé en quantités fixes. Le même virus tué par chauffage ou par le formol servira de témoin. en même temps que les liquides normaux. Le virus d'essai (virus de Newcastle vivant) sera inoculé en quantités minimales et toujours fixes (5 DL₅₀), mais à des intervalles différents.

TECHNIQUES ET MATÉRIEL.

VIRUS INTERFÉRENT. — Nous avons employé la souche « Var » 1949, dont les caractéristiques ont été étudiées antérieurement [4]. La DL₅₀ de cette souche est de 10^{-8,5} et le titre hémagglutinant varie entre 1/1 280 et 1/2 560. Des œufs de 10 jours sont inoculés avec une dilution 10⁻³ du virus à la dose de 0,10 ml. On récolte les deux liquides chorio-allantoïdien et amniotique entre la 32^e et la 48^e heure d'incubation à 36°. Pour cela, on place les œufs à + 4° pendant 2 à 4 heures, puis on récolte les deux liquides qu'on centrifuge à 1 400 g à froid pendant 10 minutes. Le liquide surnageant est recentrifugé pendant 60 minutes à 27 000 g (ultra-centrifugeuse Spinco). Après cette deuxième centrifugation, le liquide surnageant est rejeté et le culot est concentré au 1/10 de son volume original dans l'eau physiologique. La suspension de virus ainsi obtenue, répartie en plusieurs tubes de caoutchouc non vulcanisé (gomme latex) soigneusement fermés, est immédiatement soumise à la pression de 4 000 kg/cm² à 37° pendant 30 minutes.

Une autre partie du même matériel est formolée à 0,5 p. 100 48 heures au moins avant d'être employée pour l'étude du phénomène d'interférence.

Une troisième partie est inactivée par chauffage à 65° pendant 30 minutes.

TÉMOINS. — Des liquides normaux chorio-allantoïdien et amniotique d'œufs de 13 jours d'incubation sont traités de la même façon, c'est-à-dire deux centrifugations, concentration au 1/10 et pression à 4 000 kg/cm². Le matériel ainsi préparé est inoculé à des œufs de 10 jours d'incubation par la voie chorio-allantoïdienne à raison de 0,03 ml en une seule injection.

LE VIRUS D'ESSAI. — Le contrôle de l'interférence entre ces trois virus et des liquides normaux est réalisé avec un virus d'essai, provenant de la même souche, à la dose fixe de 5 DL₅₀.

TABLEAU I.

NUMERO DE L'EXPERIENCE.	VIRUS INOCULE (ml)			TEMPS D'INOCULATION DU VIRUS D'ESSAI VIVANT - RESULTATS.										TAUX D'HEMAGGLU- TINATION.				POUVOIR INFECTANT	
	VIRUS PRESSE	VIRUS CHAUFFE	VIRUS FORMOLE	TEMPOINS.	T.C-A NOR-TAUX	VOIE D'INOC.	TRENTES MINUTES.	UNE HEURE.	DEUX HEURES.	QUATRE HEURES.	HUIT HEURES.	VINGT HEURES.	VIRUS PRESSE	VIRUS 65°	VIRUS FORMOLE	V.PRESSE	V.65°	V.FORMOLE	
I	0,03	—	—	—	—	5/6	4/6	2/6	4/6	1/6	—	6/6	1/2560	—	—	—	—	—	
	—	0,03	—	—	—	—	5/6	6/6	5/6	4/6	—	4/6	—	—	1/640	—	—	—	
II	0,03	—	—	—	—	5/5	—	—	3/6	1/6	—	—	1/2560	—	—	—	—	—	
	—	0,03	—	—	—	—	—	—	—	4/6	—	—	—	—	1/1280	—	—	—	
III	0,03	—	—	—	—	10/10	—	5/10	4/10	1/10	—	10/10	1/2560	—	—	—	—	—	
	—	0,03	—	—	—	9/10	—	5/5	4/5	5/5	—	3/5	—	—	—	—	—	—	
	—	—	0,03	—	—	9/10	—	4/5	4/5	3/5	—	2/5	—	—	1/640	—	—	—	
IV	0,03	—	—	—	—	—	—	—	—	3/10	—	—	1/2560	—	—	—	—	—	
	—	0,03	—	—	—	10/10	—	—	—	8/10	—	—	—	—	—	—	—	—	
	—	—	0,03	—	—	—	—	—	—	7/10	—	—	—	—	1/640	—	—	—	
V	0,03	—	—	—	—	9/10	—	—	6/10	3/10	4/10	—	1/2560	—	—	—	—	—	
	—	0,03	—	—	—	—	—	—	—	3/10	—	—	—	—	—	—	—	—	
VI	0,03	—	—	—	—	9/10	—	—	5/10	0/10	—	—	1/2560	—	—	—	—	—	
	—	—	0,03	—	—	—	—	—	2/10	4/10	—	2/10	—	—	—	—	—	—	
VII	—	—	—	—	—	10/10	—	—	2/10	3/10	—	1/10	—	—	—	—	—	—	

Nous n'avons fait varier que l'intervalle de temps séparant l'inoculation du virus d'essai de celle du virus interférent (30 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures et 8 heures).

Ces trois virus pressés, formolés et chauffés, ont été essayés du point de vue de leurs pouvoirs infectant et hémagglutinant (voir tableau I). Le virus formolé voit baisser son pouvoir hémagglutinant et disparaître complètement son pouvoir infectant. Le virus chauffé à 65° pendant 30 minutes perd ses pouvoirs infectant et hémagglutinant. Le virus pressé garde intact son pouvoir hémagglutinant et perd complètement son pouvoir infectant.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Dans la première expérience, on inocule par la voie chorio-allantoïdienne le virus pressé et le virus formolé, puis le virus

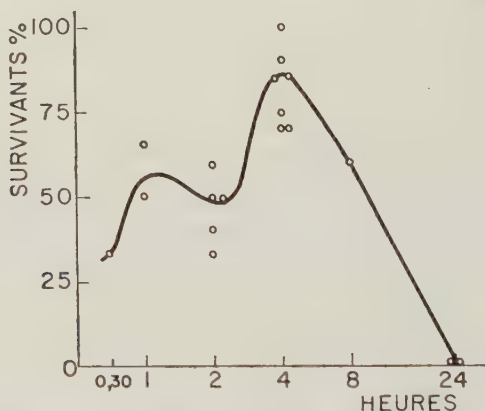


FIG. 1. — Interférence par le virus de Newcastle « Var 1949 » inactivé par les hautes pressions, chez l'embryon de poulet. Chaque point correspond à une expérience sur 6 ou 10 sujets. La dose de virus d'épreuve homologue est constante : 5 DL₅₀.

d'essai (5 DL₅₀) à des intervalles de 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures et 24 heures après les virus interférents. Sur 6 témoins inoculés avec 5 DL₅₀, pour cette expérience, un seul reste vivant. Pour le virus pressé, 2 embryons sont protégés en 30 minutes, 4 au bout de 1 heure, 2 au bout de 2 heures et 5 sur 6 au bout de 4 heures ; il n'y a aucune protection au bout de 24 heures. Le virus formolé protège 1 embryon sur 6 en 30 minutes, aucun au bout de 1 heure, 1 sur 6 au bout de 2 heures, 2 sur 6 au bout de 4 heures et 2 sur 6 au bout de 24 heures. Il semblait, d'après cette expérience, que le maximum de protection

se situait au bout de 4 heures pour le virus pressé et que l'action du virus formolé était nulle. On répète cette expérience (expérience II) en inoculant le même matériel aux mêmes intervalles. Cette deuxième expérience montre que le maximum de protection est obtenu en 4 heures avec le virus pressé (5 embryons sur 6 sont protégés), tandis que dans le même temps le virus formolé ne protège que 2 embryons sur 6.

Dans une troisième expérience réalisée dans les mêmes conditions et en ajoutant du virus chauffé à 65°, les résultats sont presque les mêmes pour le virus pressé. La protection commence 1 heure après l'inoculation du virus interférent pour atteindre un maximum en 4 heures (90 p. 100) et baisser au bout de

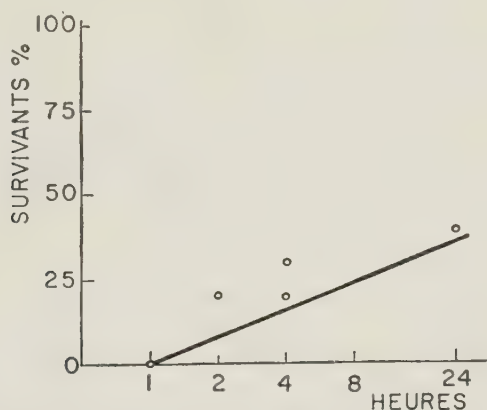


FIG. 2. — Interférence par le virus de Newcastle « Var 1949 » inactivé par chauffage à 65° pendant trente minutes. Virus d'épreuve homologue : 5 DL₅₀.

24 heures. Avec le virus formolé et pressé, on remarque une certaine protection au bout de 24 heures.

Les expériences IV et V ont montré qu'au bout de 4 heures, le virus pressé a donné une protection de 70 p. 100 et qu'ensuite (expérience V) le taux de protection baisse (voir fig. 1).

Pour le virus chauffé ou formolé (expérience faite sur un plus petit nombre d'œufs) on constate l'installation progressive de la protection jusqu'à la 24^e heure (voir fig. 2 et 3).

Les expériences V et VI montrent surtout l'action interférentielle des liquides normaux soumis aux mêmes conditions de préparation et d'inoculation. Au bout de 2 et de 4 heures il y a une certaine protection (voir fig. 4). Cette action est plus sensible vers la 4^e heure et baisse au bout de 24 heures.

Les œufs inoculés avec les liquides normaux survivant au 17^e jour sont sacrifiés. Leurs liquides mélangés sont inoculés

à des œufs neufs de 10 jours d'incubation, qui meurent dans les 48 heures de maladie de Newcastle (expériences V et VI).

Les liquides des œufs ayant résisté à l'inoculation du virus

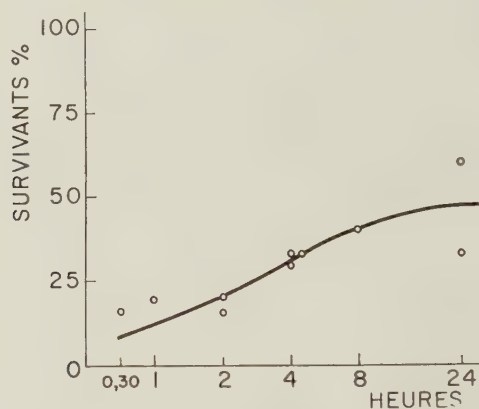


FIG. 3. — Interférence par le même virus inactivé par le formol à 0,5 %. Virus d'épreuve homologue (5 DL₅₀).

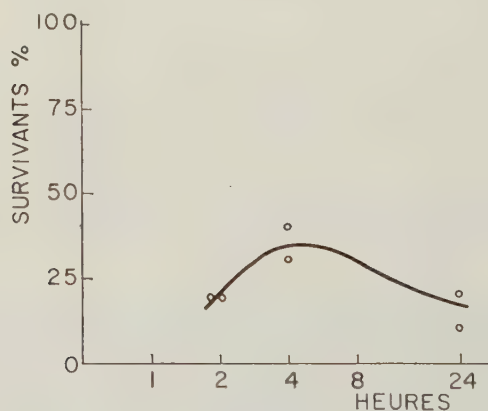


FIG. 4. — Interférence par les liquides chorio-allantoïdiens et amniotiques normaux soumis à une pression de 4 000 kg/cm² pendant trente minutes. Virus d'épreuve Newcastle « Var 1949 » (5 DL₅₀).

d'essai faite au bout de 4 heures n'ont jamais donné la maladie (expériences IV et V).

DISCUSSION.

Le phénomène d'interférence peut être réalisé avec un virus homologue inactivé par les hautes pressions. Son action est

fonction du moment auquel le virus d'épreuve est inoculé. Pour l'étude de ce phénomène dans la maladie de Newcastle, une faible dose de virus d'épreuve est nécessaire (Bang [3]). Le taux de protection obtenu avec le virus de Newcastle pressé est supérieur à celui obtenu avec le virus chauffé ou formolé. Dans ces expériences, réalisées dans les mêmes conditions, on remarque que le virus pressé protège mieux contre le virus d'épreuve vers la 4^e heure.

Le virus inactivé par chauffage ou par le formol a une action interférentielle qui augmente lentement jusqu'à la 24^e heure. Les liquides chorio-allantoïdien et amniotique témoins, concentrés et pressés, ont également un pouvoir interférentiel, mais différent par son mécanisme d'action. Les œufs inoculés avec les liquides normaux témoins et survivant au 17^e jour contiennent le virus d'essai, ce qui n'est pas le cas de ceux inoculés avec le virus pressé. Il existe probablement dans les liquides normaux, des inhibiteurs qui, concentrés et soumis à des pressions de 4 000 kg/cm², peuvent encore jouer leur rôle à la surface des cellules endothéliales dans le sens de l'inhibition de l'interférence. Leur action est faible, mais certaine.

Comme pour celui de la grippe, le pouvoir enzymatique du virus de Newcastle est probablement responsable de l'adsorption et de l'hémagglutination des hématies (Hirst [5]). Ce pouvoir n'est pas atteint par une pression de 4 000 kg/cm². Gardant malgré ce traitement, son pouvoir de destruction du récepteur de la cellule, le virus pressé sera adsorbé par les cellules endothéliales aussi facilement que le virus d'essai, quoique dans la grippe cette destruction soit sans importance dans le phénomène d'interférence [6]. Pour une masse de 10⁸ cellules chorio-allantoïdiennes, la protection interférentielle optimum obtenue à l'aide du virus pressé se situe vers la 4^e heure. Par contre, les liquides des embryons normaux de 13 jours, qui ne possèdent ni propriété granulopexique [7], ni le pouvoir d'élaborer des anticorps (F. Burnet [8]), inoculés à des embryons de 10 jours, donnent le phénomène d'interférence, mais à la surface des cellules, probablement grâce à des inhibiteurs normaux [9, 10 et 11].

Ce fait est un argument de plus permettant de penser que le phénomène d'interférence a lieu dans la cellule même, c'est-à-dire dans son équipement de multiplication [12, 13 et 6].

CONCLUSIONS.

On peut obtenir un phénomène de protection par interférence en traitant les cellules sensibles par un virus convenablement purifié et inactivé par les hautes pressions (4 000 kg/cm²). La protection commence dans les 30 minutes qui suivent l'inoculation

et atteint son maximum vers la 4^e heure. Le virus inactivé par le formol et le chauffage possède une faible action interférentielle, qui augmente légèrement vers la 24^e heure. Il existe également une interférence due aux liquides normaux chorio-allantoïdien et amniotique centrifugés, concentrés et pressés. Ce phénomène aurait lieu à la surface des cellules, puisqu'on retrouve le virus d'épreuve dans les liquides 7 jours après son inoculation. Ces faits donnent à penser que le phénomène d'interférence a lieu au sein même des cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. ATANASIU, E. BARBU et J. BASSET. *Ces Annales*, 1951, **81**, 340.
- [2] P. LÉPINE. Communication personnelle.
- [3] F. B. BANG. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 141.
- [4] P. LÉPINE, H. JACOTOT, P. ATANASIU et A. VALLÉE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 84.
- [5] G. K. HIRST. *Science*, 1941, **94**, 22.
- [6] A. ISAACS et M. EDNEY. *Austral J. exp. Biol.*, 1950, **28**, 231.
- [7] C. PÉREZ DEL CASTILLO et P. ATANASIU. Travail inédit.
- [8] F. BURNET. *Austral J. exp. Biol.*, 1941, **19**, 291.
- [9] R. CUNHA et coll. *J. Immunol.*, 1947, **57**, 55.
- [10] P. H. HARDY et F. L. HORSFALL. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 463.
- [11] A. SVEDMYR. *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 295.
- [12] S. E. LURIA et DELBRÜCK. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 207.
- [13] W. HENLE et G. HENLE. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 347.

ÉVOLUTION VERS LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES GERMES ISOLÉS A PARIS CHEZ LES MALADES DE VILLE DE 1949 A 1954

par G. TERRIAL et Y. CHABBERT (*).

(Laboratoire Bruneau et Laboratoire de l'Hôpital Pasteur)

L'augmentation d'année en année du pourcentage des souches résistantes à divers antibiotiques est un phénomène bien connu. Très tôt on s'est rendu compte que cette évolution ne se faisait pas de la même manière dans les milieux qui permettaient des contagions nombreux et chez les malades isolés. Dès 1949, M. Barber et coll. [4] signalent l'augmentation en clinique hospitalière des Staphylocoques producteurs de pénicillinase, tandis que Forbes [2] montre que chez les malades isolés le taux reste faible (12 p. 100). Actuellement les pourcentages de ces Staphylocoques isolés dans les hôpitaux sont très élevés. Dukes et coll. [3], Parmala [4], Rantz et coll. [5], Finland et coll. [6] les situent autour de 70 p. 100. Ils sont cependant susceptibles de régression lorsque des mesures d'hygiène sont prises ou qu'un autre antibiotique est utilisé (Gerbeaux [7], Lepper et coll. [8]). Mais pour certains la différence subsiste toujours entre une population fermée et la population générale. Oswald et coll. [9], en 1954, obtiennent dans le personnel de l'U. S. Food and Drug Administration 72 p. 100 de Staphylocoques résistants, 50 p. 100 dans une prison et 17 p. 100 seulement chez les sujets isolés. Ce dernier chiffre, très voisin de celui obtenu en 1945, leur fait dire qu'« il n'y a pas d'augmentation des Staphylocoques pénicillino-résistants dans la population générale des dix dernières années ». De fait, dans les pays où la Pénicilline a été peu utilisée, les pourcentages restent faibles. Gupta et Chakravarti [10], aux Indes, observent 90 p. 100 de souches sensibles. Pour d'autres germes, notamment les bacilles coliformes, les *Proteus* et les bacilles pyocyaniques, l'augmentation des pourcentages des souches résistantes est très diversement appréciée. Rantz et coll. [5], Weil et Stempel [11], par exemple, n'observent pas d'évolution. Lutz et Hofferer [12], Schneierson [13],

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1955.

Jackson et coll. [14] obtiennent une évolution nette pour un type de germe ou un antibiotique.

Il semble donc que cette évolution, tout en frappant de façon prédominante le Staphylocoque, soit un phénomène local très variable suivant la population étudiée. Il est donc très important de faire constamment le point pour des populations différentes afin de renseigner les cliniciens pour les cas où un antibiogramme n'est pas possible.

Dans plusieurs études antérieures [15, 16], nous avons apporté notre contribution en ce qui concerne les malades isolés, adressés à un laboratoire clinique de la ville à Paris depuis 1948. En reprenant les chiffres antérieurs nous étudions l'évolution observée de 1948 à 1954 sur environ 1 000 souches annuelles appartenant à diverses espèces. La technique de titrage utilisée est une méthode de diffusion en gélose utilisant des disques séchés. La lecture, décrite par l'un de nous [17], se fait par rapport à une souche-test sur des courbes de concordances établies par comparaison avec la technique des stries en gélose. La technique, la population des malades et la fréquence des différentes espèces microbiennes ont peu varié d'une année à l'autre et il semble possible de comparer statistiquement les divers pourcentages.

RÉSULTATS.

Les résultats sont figurés sur le tableau I pour les Staphylocoques.

Pour la Pénicilline les pourcentages de souches productrices de

TABLEAU I. — Pourcentage des souches résistantes.

ANNÉES	NOMBRE DE SOUCHES	PÉNICILLINE p. 100	STREPTOMYCINE p. 100	CHLORAMPHÉNICOL p. 100	CHLORTÉTRACYCLINE p. 100
1948	50	14	4		
1949	60	35	10		
1950	103	40	11	1	1
1951	241	55	8	4	5
1952	306	68	23	12	22
1953	397	64	21	10	24
1954	255	72	24	16	36

Pour la pénicilline, pourcentage des souches productrices de pénicillinase.

Pour les autres antibiotiques, pourcentage des souches résistantes à plus de 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

pénicillinase sont en augmentation croissante jusqu'en 1952 ; depuis les différences ne sont pas significatives. Le taux est voisin de celui observé dans les milieux hospitaliers. Pour les trois autres antibiotiques l'évolution a été significative entre 1951 et 1952. Depuis, il y a eu peu d'évolution pour la Streptomycine et le Chloramphénicol ; la régression entre 1952 et 1953 n'est pas significative. Pour la Chlortétracycline l'augmentation en 1954 sur 1952 est significative ($p. < 0,001$).

En 1954, sur 228 souches titrées vis-à-vis de l'Erythromycine, une seule était résistante.

Dans la figure 1 on trouve les résultats obtenus de 1949 à 1954, d'une part pour les pneumocoques et des Streptocoques β hémolytiques dont une partie a été étudiée sérologiquement et appartenait au groupe A, d'autre part, pour les entérobactéries lactosopositives rangées sous le terme de bacilles coliformes.

Pour les pneumocoques et les Streptocoques étudiés on trouve toujours pour la Pénicilline, l'Auréomycine et le Chloramphénicol des taux de souches résistantes inférieurs à 5 p. 100 sans qu'aucune évolution se dessine. Pour la Streptomycine, la sensibilité de ces germes est d'emblée moindre, avec un pourcentage important de souches-limites. Il n'y a donc pas, pour ce type de germe rencontré de façon prédominante dans les voies aériennes supérieures, de pertes d'efficacité des antibiotiques classiques.

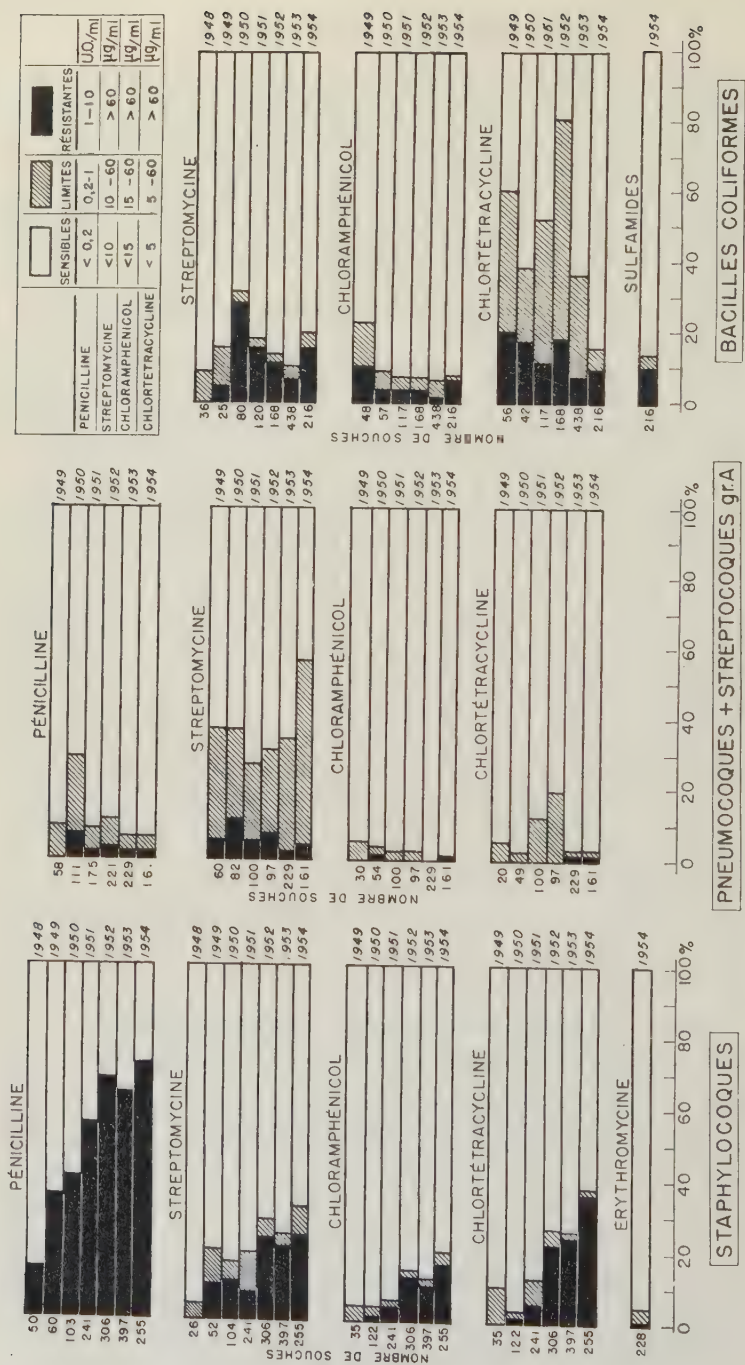
Pour les bacilles coliformes étudiés, en majorité d'origine urinaire ou fécale, il n'y a pas non plus d'évolution et en 1954 nous avons même observé une diminution significative du pourcentage des souches ayant une sensibilité-limite à la Chlortétracycline. Le nombre de souches résistantes aux sulfamides en général est faible et se situe autour de 10 p. 100.

En ce qui concerne les germes du genre *Proteus*, nous avons examiné, en 1954, 59 souches de *P. mirabilis* et 88 souches de *P. morgani*. Les résultats figurent dans le tableau II. Nous retrou-

TABLEAU II. — Nombre de souches résistantes en 1954.

ESPÈCES	NOMBRE de souches	STREPTOMYCINE	CHLORAMPHÉNICOL	CHLORTÉTRACYCLINE
<i>P. mirabilis</i> .	59	3	3	58
<i>P. morgani</i> .	88	2	14	26
	147	5	17	84

vons la différence de sensibilité de ces deux espèces vis-à-vis de la Chlortétracycline, mise en évidence récemment par Potee,



Wright et Finland, mais à l'inverse de ce qu'ils ont observé, il y a depuis 1953 une augmentation de la sensibilité à cet antibiotique (18 p. 100 de souches sensibles sur 214 en 1952 et 43 p. 100 sur 147 en 1954), bien que le pourcentage de *P. morgani* par rapport à *P. mirabilis* n'ait pas changé de la même façon.

Pour *Ps. aeruginosa* les pourcentages de souches sensibles ou limites sont toujours faibles, autour de 10 p. 100 pour les divers antibiotiques, ce qui est très inférieur à ce que nous avons observé en 1949 (50 p. 100) et implique la nécessité de faire appel de plus en plus à d'autres antibiotiques.

RÉSUMÉ.

Chez les Staphylocoques, on observe depuis 1949 une augmentation des souches résistantes. Pour la Pénicilline dans la population de malades isolés que nous étudions, le taux atteint en 1954 est celui qui est obtenu depuis plusieurs années en milieu hospitalier. Pour la Streptomycine, le Chloramphénicol et la Chlorotétracycline cette évolution est nette, mais la résistance ne se rencontre encore que chez un quart des souches.

Pour les Pneumocoques, les Streptocoques du groupe A, il n'y a pas d'évolution pour aucun de ces antibiotiques.

Pour les B. coliformes et les *Proteus*, il n'y a pas non plus d'évolution, mais plutôt une tendance à une plus grande sensibilité.

Peu de souches de *Ps. aeruginosa* sont sensibles aux antibiotiques classiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BARBER, F. G. J. MAYHOE et J. E. M. WHITEHEAD. *Lancet*, 1949, 1120.
- [2] G. B. FORBES. *Brit. med. J.*, 1949, **41**, 569.
- [3] C. D. DUKES et A. M. DUKES. *Antib. Ann.*, 1953-1954, 70.
- [4] M. E. PARMALA. *Arbeit sero-bakt. Inst. Univ. Helsinki*, 1953, **22**, 437.
- [5] L. A. RANTZ et H. H. RANTZ. *Stanford Med. Bull. U. S. A.*, 1953, **2**, 183.
- [6] M. FINLAND et T. H. HAIGHT. *Arch. int. Med.*, 1953, **91**, 143.
- [7] CL. GERBEAUX. *Journées des Pédiatres, Hôpital des Enfants-Malades*, Paris, 1954, 69.
- [8] M. H. LEPPER, H. F. DOWNLING, G. G. JACKSON, B. MOULTON et H. W. SPIES. *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, **42**, 832.
- [9] E. J. OSWALD, R. J. REEDY, W. A. RANDALL et H. WELCH. *Antib. Ann.*, 1953-1954, 318.
- [10] S. P. GUPTA et R. N. CHAKRAVARTI. *Indian J. med. Res.*, 1954, **42**, 159.
- [11] A. J. WEIL et B. STEMPEL. *Antib. et Chemoth.*, 1953, **3**, 1135.

- [12] A. LUTZ et M. J. HOFFERER. *Strasbourg méd.*, 1954, **5**, 541.
- [13] S. SCHNEIERSON. *J. Lab. Clin. Med.*, 1952, **40**, 48.
- [14] G. JACKSON, E. VICHER et J. SOSKA. *Amer. J. Clin. Path.*, 1953, **3**, 297.
- [15] Y. CHABBERT et G. TERRIAL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 499.
- [16] Y. CHABBERT, G. TERRIAL et M. P. SCHUTZENBERGER. *Ces Annales*, 1953, **84**, 952.
- [17] Y. CHABBERT. *Ann. Biol. clin.*, 1951, **9**, 544.
- [18] K. G. POTEÉ, S. S. WRIGHT et M. FINLAND. *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, **44**, 463.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 7 Avril 1955.

COMMUNICATIONS

RECHERCHES SUR LA MICROFLORE DES TERREAUX NATURELS ET ARTIFICIELS

par J. POCHON, H. DE BARJAC et M.-A. CHALVIGNAC.

(*Institut Pasteur. Service de Microbiologie du Sol*)

L'importance de la fumure organique pour le maintien de la fertilité de certains sols et pour leur conservation, pour la mise en valeur de terrains pauvres, pour la régénération de sols épuisés ou en voie d'érosion, apparaît de plus en plus clairement. L'emploi des engrais minéraux, seuls, n'y peut suffire ; mal réglé, il peut même hâter l'évolution défavorable des sols.

Par ailleurs, la diminution des quantités disponibles de fumiers naturels, l'impossibilité, parfois, d'utiliser l'enfouissement d'engrais verts, ont incité, depuis quelques années surtout, à augmenter la production et à perfectionner les techniques de fabrication des fumiers et terreaux artificiels. Ceux qui sont correctement préparés se rapprochent beaucoup, par leur composition chimique, des terreaux naturels. Qu'en est-il de leur microflore ?

Nous envisageons ici de comparer les microflores de terreaux naturels (type terreau de couche des jardiniers) et des terreaux artificiels ; on pourrait même les qualifier de terreaux « industriels » en ce sens que la matière première utilisée, ou une partie de celle-ci, est souvent un sous-produit industriel et que leur technique de préparation, dans le but de hâter la fermentation, s'apparente plus à celles de l'industrie qu'à celles de l'agriculture.

Nous avons pratiqué l'analyse microbiologique de terreaux d'origine et de fabrication très diverses : tourteaux d'oléagineux, pailles préalablement traitées pour la préparation du furfurool, tourbes ou déchets agricoles additionnés de sous-produits d'industrie de fermentation. Tous ces engrais organiques avaient l'aspect du terreau de couche,

finement tamisé. Le terreau naturel témoin provenait de l'Institut Pasteur de Garches.

L'analyse microbiologique a porté sur la microflore totale (bactéries, actinomycètes et champignons) et surtout sur l'activité des grands groupements microbiens à action physiologique définie : cycle de l'azote (fixation, ammonification, nitrification, dénitrification) ; cycle du carbone (cellulolyse, amylolyse) et cycle du soufre (oxydants et réducteurs). Il s'agit donc essentiellement d'une analyse écologique des germes d'intérêt agronomique (1).

Les résultats sont remarquablement constants et permettent d'opposer nettement terreaux naturels et artificiels.

MICROFLORE TOTALE. — On sait que les chiffres obtenus par les différentes méthodes de numération ne peuvent être admis comme ayant une valeur absolue ; cependant, les nombres trouvés avec une même méthode, sur différentes terres, ont une valeur comparative et permettent de classer ces terres relativement les unes aux autres.

Ces réserves faites, nos résultats montrent que les terreaux naturels ont une microflore totale bactérienne riche, de l'ordre de 500 à 800 millions de germes par gramme (chiffres environ dix fois supérieurs à ceux trouvés, par la même méthode, pour la plupart des terres en culture). La microflore des terreaux artificiels est, dans la majorité des cas, plus riche encore, atteignant jusqu'à 10 milliards par gramme (même ceux préparés à partir de tourbes initialement très pauvres, moins de 100 millions).

Il y a donc une multiplication bactérienne intense au cours des processus de fermentation accélérée de la fabrication ; mais nous verrons que les bactéries ainsi développées sont loin d'appartenir toutes aux groupements fonctionnels microbiens caractéristiques des sols normaux et sont vraisemblablement sans grand intérêt agronomique.

En ce qui concerne actinomycètes et champignons, les différences sont moins nettes (peut-être à cause de l'imprécision des méthodes de numération) et l'on ne peut établir de règles générales.

GERMES DU CYCLE DE L'AZOTE. — *Groupe des fixateurs d'azote.* — Que l'on opère sur terre moulée ou sur silico-gel, l'opposition est absolue en ce qui concerne les fixateurs aérobies (*Azotobacter*) : les terreaux naturels sont riches ; les terreaux artificiels analysés sont constamment et totalement dépourvus de ces germes.

Par contre, la teneur en fixateurs anaérobies (*Clostridium*) est sensiblement la même pour les deux types. Il est vraisemblable que les *Azotobacter*, déjà peu abondants ou absents dans les matières premières employées, sont tués, du fait de leur faible tolérance thermique, au cours de la fabrication des terreaux artificiels et que, de plus, ils sont inhibés pendant les phases d'anaérobiose. Elévation thermique et anaérobiose ont, au contraire, une action sélective favorable sur les *Clostridium*.

Groupe des ammonifiants et protéolytiques. — La haute teneur en substances carbonées et le rapport C/N élevé des terreaux rendent

(1) Pour les techniques utilisées voir : J. Pochon et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique des sols*, Masson édit., Paris, 1954.

inutilisable la méthode de mesure en terreau additionné de poudre de sang. La technique à la tyrosine montre le plus souvent une activité plus élevée de la microflore ammonifiante dans les terreaux naturels que dans les artificiels. Même résultat en ce qui concerne la microflore protéolytique par mesure sur milieu à la gélatine.

Groupe des nitrificateurs. — Qu'il s'agisse des germes nitreux ou des germes nitriques, que la mesure d'activité soit réalisée sur silico-gel ou en milieu liquide, on note des différences considérables : les terreaux naturels sont très actifs (20 à 65 p. 100 de grains positifs sur silico-gel ; nitrification jusqu'à la dilution 10^{-8} en milieu liquide). Les terreaux artificiels sont presque totalement inactifs (0 à 10 p. 100 de grains positifs ; nitrification jusqu'à la dilution 10^{-2}). Les germes nitriques sont encore moins actifs que les germes nitreux.

Ici encore, comme pour les *Azotobacter*, la faible teneur en germes nitrificateurs des matières premières et leur inhibition de développement en anaérobiose expliquent cette déficience des terreaux artificiels.

Groupe des dénitrificateurs. — L'activité de ce groupement, mesurée en milieu liquide, est aussi élevée dans les deux types ; elle est parfois très forte dans certains terreaux artificiels.

GERMES DU CYCLE DU CARBONE. — *Groupe des cellulolytiques.* — Les très grandes richesses et activité de la microflore cellulolytique *aérobie* des terreaux naturels contrastent vivement avec la pauvreté des terreaux artificiels. Qualitativement aussi : *Cytophaga* et *Cellvibrio* dominant dans les premiers, espèces polyphages peu actives dans les seconds.

La différence est moins nette en ce qui concerne les cellulolytiques anaérobies, mésophiles et thermophiles, mais elle est parfois en faveur des terreaux artificiels.

Groupe des amylolytiques. — Sauf pour les terreaux artificiels, dont la matière première est riche en amidon, ou qui sont arrosés avec des sous-produits d'industrie d'amidonerie, l'activité amylolytique est plus forte dans les terreaux naturels.

GERMES DU CYCLE DU SOUFRE. — En ce qui concerne les réducteurs de sulfate (*Sporovibrio*) ils semblent plus actifs dans les terreaux naturels. La différence est moins nette pour les oxydants de S et de SH_2 .

ALGUES. — Abondantes dans les terreaux naturels, elles font totalement défaut dans les artificiels.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Malgré leurs analogies physiques et chimiques apparentes, qu'il est d'ailleurs difficile de préciser dans notre ignorance de la nature intime des complexes humiques, les terreaux naturels et artificiels diffèrent profondément quant à leur microflore.

Les plus importants groupements physiologiques, dont le rôle est capital, fixateurs aérobies (y compris les algues), nitrificateurs, cellulolytiques aérobies, sont absents ou d'activité très réduite dans la plupart des terreaux artificiels. En général, du fait des processus de

fermentation accélérée, les espèces aérobies de ces groupements sont moins favorisées que les espèces anaérobies qui prennent alors le dessus.

Cette pauvreté pourrait paraître en contradiction avec l'énorme pullulation de germes numérés lors de la détermination de la microflore totale. Il s'agit probablement ici de germes d'apport, différents de ceux d'une microflore tellurique normale ; peut-être aussi d'une partie de cette microflore préférentiellement stimulée. Le rôle de ces germes, s'il en est un, au cours de la fermentation et ultérieurement dans le sol, resterait à déterminer ; il semble que l'activité de certains groupement (protéolytiques, nitrificateurs) incite à leur attribuer en général un pouvoir protéolytique et dénitrifiant élevé. La microflore des terreaux artificiels apparaît, en fin de compte, comme déséquilibrée par rapport à celle des terreaux naturels.

Il est donc vraisemblable de penser que l'action favorable éventuelle des terreaux artificiels serait surtout en rapport avec l'introduction dans le sol d'humus « préfabriqué » et de substances énergétiques (celles-ci pouvant d'ailleurs, secondairement, stimuler la microflore du sol). L'apport en bactéries essentielles au métabolisme des principaux cycles apparaît au contraire beaucoup plus restreint et généralement très incomplet.

SUR LES PARALYSIES DES SOURIS IMMUNISÉES DANS LE TEST DE PROTECTION DES DIFFÉRENTS VACCINS ANTIRABIKES

par Z. JELESIC et P. ATANASIU.

(*Institut Pasteur. Service des Virus.*)

Au cours du test de protection contre la rage pratiqué sur des souris vaccinées, on a généralement observé que la mortalité des souris était d'autant plus élevée que la dilution du virus d'épreuve était plus forte [10—³] (Habel [1]). L'explication de ce phénomène serait la suivante : il s'agirait de l'effet d'une immunité locale que le virus d'essai, à forte concentration, déterminerait chez les animaux vaccinés, provoquant ainsi *in situ* une production d'anticorps tissulaires suffisante à la survie de ces animaux.

A ce phénomène s'ajoute celui de l'auto-stérilisation mortelle (Levaditi [2]), en vertu duquel une partie des souris vaccinées, en particulier celles qui ont reçu un vaccin fort, succombent néanmoins à la rage, mais font des paralysies et meurent sans qu'on puisse mettre en évidence le virus d'épreuve. Du point de vue anatomo-pathologique, le cerveau de ces animaux présente une encéphalite rabique typique.

Il ne semble pas douteux que les souris meurent du fait de l'intensité d'une réaction d'immunité locale.

Dans la présente communication nous nous proposons de comparer parallèlement l'indice de protection des différents vaccins, la mise en évidence du virus dans le cerveau des souris paralysées et les lésions anatomo-pathologiques observées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Vaccins soumis à l'épreuve.* — Nos animaux ont été vaccinés avec quatre vaccins (A, B, C, D), différents par leur valeur immunisante.

Ce sont :

Vaccin A : suspension à 5 p. 100 de tissu cérébral de lapin dans l'eau physiologique phéniquée à 1 p. 100.

Vaccin B : suspension de cerveau de mouton dans l'eau physiologique phéniquée à 1 p. 100. L'inactivation du virus se fait en vingt-quatre heures à 22°.

Vaccin C : suspension de tissu cérébral de mouton dans l'eau physiologique tamponnée à pH 7,6 et phéniquée à 0,5 p. 100. Le virus est inactivé huit jours à 37°. Le pH final est 7,2.

Vaccin D : vaccin U. V. desséché ; 10 p. 100 de tissu cérébral de lapin en suspension dans l'eau distillée et contenant 0,25 p. 100 d'acide phénique et 0,01 p. 100 de thiomersal.

Titrage. — La méthode de titrage des différents vaccins est celle décrite par Habel [3]. On pratique six injections de vaccin dilué à 0,5 p. 100 à raison de 0,5 ml tous les deux jours, par voie intrapéritonéale, à une cinquantaine de souris de même poids variant entre 12 et 14 g. L'épreuve de contrôle est faite par l'inoculation de différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-5}) avec la souche C. V. S. (1) [DL₅₀ variant entre $10^{-6,25}$ et $10^{-6,43}$], à raison de 0,03 ml par voie intracérébrale. L'indice de protection est calculé le vingt-huitième jour par la méthode des totaux cumulatifs de Reed et Muench [4].

Les souris paralysées ou agonisantes ayant reçu les dilutions 10^{-4} , 10^{-3} , et 10^{-2} du virus d'épreuve sont sacrifiées. Une partie du cerveau et de la moelle est prélevée en vue des coupes anatomo-pathologiques, l'autre partie est réservée pour les passages. Les émulsions de cerveaux sont inoculées à des souris neuves à des dilutions variant de 10^{-1} à 10^{-3} . Le vingt-huitième jour, nous avons également sacrifié des souris vaccinées mais non soumises au virus d'épreuve pour voir si elles présentaient des lésions anatomo-pathologiques. De plus, toujours au vingt-huitième jour, nous avons sacrifié des souris vaccinées et ayant résisté au test d'épreuve pour en étudier également les lésions anatomo-pathologiques.

RÉSULTATS. — Dès le début de nos essais, nous avons été frappés par deux faits : d'une part les souris vaccinées avec des vaccins très actifs (vaccins C et D) présentaient des paralysies et des quadriplégies typiques de rage, pleinement confirmées par les lésions anatomo-pathologiques d'encéphalite et de méningite ; on n'a cependant pas pu montrer la présence du virus rabique par passage à des animaux neufs.

(1) Obligeamment fournie par le Dr Martin Kaplan, chef de la Section de Médecine Vétérinaire, O. M. S.

Par contre, chez les souris vaccinées avec un vaccin de faible activité (A et B) puis paralysées avec le virus d'épreuve, le cerveau et la moelle inoculés à des animaux neufs ont toujours transmis la maladie ; parallèlement, le taux de protection de ces vaccins est toujours bas (tableau I).

TABLEAU I.

VACCIN	CVS EMPLOYÉ pour inoculation des souris immunisées		TAUX de protection	PASSAGE	
	LD ₅₀	Dilution		Dilution	p. 100 de mortalité
« A »	10 - 6,43	10 - 4	134	10 - 1 10 - 2 10 - 3	100
« B »	10 - 6,43	10 - 4	1 258	10 - 1 10 - 2 10 - 3	100
« C »	10 - 6,43	10 - 4	67 608	10 - 1 10 - 2 10 - 3	0
		10 - 2		10 - 1 10 - 2 10 - 3	0
« D »	10 - 6,43	10 - 2	8 600	10 - 1 10 - 2 10 - 3	0
		10 - 3		10 - 1 10 - 2 10 - 3	0

Témoins. — Chez les souris vaccinées mais non éprouvées avec le virus d'épreuve et sacrifiées le vingt-huitième jour, on ne put mettre en évidence, soit par examen anatomo-pathologique du cerveau, soit par passage à des animaux neufs, la présence de virus ou de lésions caractéristiques de rage.

Les résultats furent similaires chez les souris vaccinées qui avaient résisté au virus d'essai et avaient été sacrifiées le vingt-huitième jour.

Discussion. — La maladie décrite par C. Levaditi [2], sous le nom de « neuro-infection mortelle auto-stérilisable » a été rencontrée dans la rage soit avant une immunisation chez différentes espèces d'animaux : chez le lapin (P. Lépine [5]), le coq et le pigeon (P. Remlinger et J. Bailly [6]) ; rage des rues chez le hérisson (D. Jonnesco [7]) ; ouloufato chez le lapin (S. Nicolau et coll. [8]) ; chez le lapin avec le virus Flury (H. Koprowski et H. R. Cox [9]) ; soit après la vaccination contre la rage (C. Levaditi et coll. [2] ; Nicolau et L. Kopciowska [10] ; D. Jonnesco [41] ; J. Balteanu et coll. [42] ; D'Silva [43]).

Dans les deux cas, le virus rabique associé à l'apparition d'une réaction immunitaire locale trop intense est responsable de la mort ou de la paralysie de ces animaux.

Dans le test de protection de la souris par la technique de Habel pour le contrôle des vaccins antirabiques, nous sommes en présence de deux catégories de vaccins : les vaccins à faible pouvoir protecteur (A et B) et les vaccins à fort pouvoir protecteur (C et D).

Pour les bons vaccins, le vaccin C par exemple, malgré l'apparition de paralysies chez les souris recevant les dilutions 10^{-4} et 10^{-2} , l'inoculation de leur cerveau broyé et dilué à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} à des souris neuves donne des résultats négatifs (tableau I).

Par contre, pour les souris vaccinées avec un vaccin très faible (A) ou avec un vaccin dont le pouvoir protecteur est juste suffisant (B), nous avons toujours retrouvé le virus.

Pour les deux catégories de vaccins, nous nous trouvons devant des paralysies mortelles avec des lésions anatomo-pathologiques du type rage fixe, mais, dans le premier cas, les lésions sont la conséquence d'une réaction locale trop forte provoquée par le virus qui disparaît ; dans le deuxième cas, les lésions sont également causées par le virus, mais celui-ci reste présent.

La question se pose de savoir si on pourra parvenir, dans le calcul des totaux cumulatifs, à différencier ces deux sortes de paralysies et, par conséquent, à améliorer le test de Habel, au passif duquel les morts avec autostérilisation sont actuellement portées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. HABEL et J. T. WRIGHT. *Publ. Hlth. Rep.*, 1948, **63**, 44.
- [2] C. LEVADITI, V. SANCHIS-BAYARRI et R. SCHOEN. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 911.
- [3] K. HABEL in *La rage, techniques de laboratoire*, Org. mond. Santé, Sér. Monogr., 1955, n° 23, 114.
- [4] L. J. REED et H. MUENCH. *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [5] P. LÉPINE et V. SAUTTER. *Ces Annales*, 1937, **59**, 39.
- [6] P. REMLINGER et J. BAILLY. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 296.
- [7] D. JONNESCO. *Ces Annales*, 1932, **48**, 735.
- [8] S. NICOLAU, C. MATHIS et V. CONSTANTINESCO. *Ces Annales*, 1933, **50**, 778.
- [9] H. KOPROWSKI et H. R. COX. *J. Immunol.*, 1948, **60**, 533.
- [10] S. NICOLAU et L. KOPCIOWSKA. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 1139.
- [11] D. JONNESCO. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 1249.
- [12] J. BALTEANU, N. CONSTANTINESCO et A. TOMA. *Bull. Acad. Méd. Roum.*, 1944, **14**, 707.
- [13] C. B. D'SILVA. *Indian J. med. Res.*, 1952, **40**, 317.

MILIEU D'ENRICHISSEMENT ET TECHNIQUE D'ISOLEMENT DES *E. COLI* DES GASTRO-ENTÉRITES INFANTILES (*)

par CLAUDE GERBEAUX (**).

(Laboratoire de Bactériologie du Service du professeur R. DEBRÉ,
Hôpital des Enfants-Malades)

Les *E. coli* des types 111:B4, 26:B6, 55:B5 sont en général facilement isolés des selles diarrhéiques des nourrissons atteints de gastro-entérites infectieuses rapportées à ces germes. En effet, à la phase aiguë de la maladie, ils forment la quasi totalité de la flore intestinale et il n'est pas rare de les obtenir en culture pure.

L'isolement de ces *E. coli* dans le rhino-pharynx des enfants est déjà plus délicat en raison de la proportion plus réduite de ces germes (sauf de rares cas où nous les avons trouvés en prédominance) et de leur passage rapide à ce niveau.

Par contre, la présence de ces *E. coli* est beaucoup plus difficile à déceler soit dans les selles, soit dans le rhino-pharynx, en dehors de la phase aiguë de la maladie :

- a) Enfant infecté, en période d'incubation ;
- b) Enfant traité par antibiothérapie et non complètement stérilisé, susceptible de faire une rechute ;
- c) Porteurs sains de ces *E. coli*.

Dans ces cas, les *E. coli* incriminés ne se trouvent qu'en très faible proportion dans les prélèvements et assez souvent leur recherche sera négative.

Si l'on prend en considération la gravité de ces gastro-entérites à *E. coli* chez les nourrissons, leur contagiosité indéniable et la fréquence des rechutes de la maladie, on voit l'intérêt, dans une crèche, de déceler leur présence, en si faible quantité qu'ils soient, pour :

1° Traiter l'enfant en incubation avant l'apparition des troubles graves qui peuvent aller jusqu'à la mort.

2° Déceler l'infection chez le nourrisson admis à l'hôpital avant qu'il ne contamine d'autres enfants et pouvoir prendre les mesures prophylactiques nécessaires. Un seul enfant infecté admis dans une crèche peut être le point de départ d'une épidémie.

3° Contrôler que l'enfant qui a été traité pour sa gastro-entérite à *E. coli* est bien stérilisé quant à ce germe et éviter qu'il ne soit

(*) Travail effectué grâce à une subvention du Centre National de la Recherche Scientifique.

(**) Nous tenons à remercier MM. les Drs Le Minor et P. Nicolle, de l'Institut Pasteur, qui ont bien voulu contrôler et typer toutes nos souches d'*E. coli* des G. E. I. et nous aider de leurs conseils, ainsi que M^{lle} Gaugain, dont la collaboration nous a été très précieuse.

réhospitalisé quelques jours plus tard pour une rechute, après avoir peut-être contaminé d'autres enfants au sein de sa famille.

MILIEU.

Ces faits nous ont incité à rechercher la mise au point d'un milieu d'enrichissement qui nous permette d'obtenir une culture prédominante des *E. coli* (types 111:B4, 26:B6, 55:B5) à partir de prélèvements pauvres en ces germes par rapport aux autres espèces.

La mise au point de ce milieu fut grandement facilitée par le fait que nous avons eu la possibilité de faire nos essais, non seulement sur des souches conservées à cette intention, mais surtout sur les prélèvements mêmes. Un germe directement « sorti de l'organisme » ne se comporte pas toujours comme une souche déjà entraînée sur les milieux de culture. Nous avons souvent vérifié cette notion au cours de nos essais, ce qui nous a amené à supprimer ou modifier certains constituants de ce milieu d'enrichissement ou leur concentration.

Nous avons été amené à la formule suivante utilisée à l'heure actuelle à la Clinique médicale des Enfants, pour toute recherche des *E. coli* des gastro-entérites infantiles.

I. — Peptone	10 g
NaCl	5 g
Autolysat de levure	2 g
Eau	900 cm ³
Ajuster pH 7,2	
Filtrer-autoclaver.	

II. — Ramener au volume de 900 cm³ avec de l'eau distillée stérile s'il y a lieu. Puis ajouter :

Cristal violet en solution alcoolique à 60°, à 0,25 p. 100	1 cm ³
Solution acide phénique à 9 p. 1 000	100 cm ³
Solution stérile lactose à 30 p. 100	10 cm ³

III. — Répartir en tubes stériles (10 cm³) capuchonnés aussitôt.

Ce milieu que nous cherchons actuellement à perfectionner surtout du point de vue sélectif nous semble recommandable dès à présent pour les raisons suivantes :

1° Tous les prélèvements effectués à l'aide de ce milieu ont été positifs lorsque ceux réalisés par la méthode directe habituelle l'ont été.

2° Dans les cas où la méthode directe et la méthode d'enrichissement donnaient un résultat positif, le nombre de colonies de colibacilles des gastro-entérites infantiles était bien supérieur par la méthode d'enrichissement à ce qu'il était par la méthode directe (citons un cas où une seule colonie de 111:B4 fut décelée par la méthode directe et où plus de 50 p. 100 des colonies de 111:B4 étaient retrouvées sur le milieu d'isolement après enrichissement).

3° Sur 500 coprocultures systématiques effectuées à l'entrée d'enfants hospitalisés, nous avons obtenu :

45 résultats positifs par la méthode directe ;

56 résultats positifs après enrichissement.

Ces deux méthodes étant appliquées comparativement à chaque prélèvement.

Avec notre milieu d'enrichissement nous avons donc obtenu 11 prélèvements positifs, sur un total de 56, qui auraient été négatifs par la méthode directe.

Au cours de notre étude sur l'infection de crèche à *E. coli* 111: B4 nous n'avons jamais pu retrouver ce germe dans les prélèvements d'air effectués par la méthode directe (ceci, peut-être, en raison de la pollution relativement faible de l'air ambiant de la crèche). *Nous l'avons décelé douze fois par notre méthode d'enrichissement.*

Nous croyons donc que ce milieu peut actuellement rendre service, à la fois sur le plan clinique et sur le plan épidémiologique, dans la recherche des *E. coli* des gastro-entérites infantiles.

TECHNIQUE D'ISOLEMENT.

A l'aide de ce milieu d'enrichissement nous avons cherché les modalités particulières à chaque prélèvement, modalités susceptibles d'avoir le meilleur rendement. Actuellement, nous procédons comme suit.

1° PRÉLÈVEMENTS ET ENSEMENCEMENT. — a) *Prélèvements de gorge.* — Les prélèvements de gorge sont effectués à l'aide d'un porte-tampon stérile imbibé préalablement de milieu d'enrichissement. Ce porte-tampon est ensuite plongé dans le milieu et le tout mis à l'étuve vingt-quatre heures.

b) *Prélèvement de selle.* — Un volume de la valeur d'une noisette est mis en suspension dans le milieu d'enrichissement. La culture est faite pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37° ou mieux à 41° suivant le conseil de M. le Dr Le Minor.

c) *Prélèvement d'air.* — Une boîte de Petri contenant 20 cm³ au moins du milieu est placée ouverte pendant vingt-quatre heures dans la pièce où l'air doit être analysé. La boîte est mise ensuite à l'étuve pendant vingt-quatre à quarante-huit heures.

d) *Prélèvements divers.* — Mains, matériel, linges, draps, couches, etc. Ces prélèvements seront faits comme les prélèvements de gorge.

2° ISOLEMENT. — Après culture de vingt-quatre heures dans le milieu d'enrichissement, l'isolement d'*E. coli* sera pratiqué sur gélose de Drigalski (délivrée par l'Institut Pasteur) par épuisement de façon à obtenir des colonies bien isolées.

3° IDENTIFICATION. — Pratiquement, nous prélevons sur chaque boîte 6 colonies pour en étudier l'agglutinabilité dans les sérums spécifiques.

2 colonies dans le sérum anti-111: B4.

2 colonies dans le sérum anti-26: B6.

2 colonies dans le sérum anti-55: B5.

Mais, sur les 6 colonies soumises à l'agglutination, l'effet du hasard joue un rôle important. Chaque groupe de deux colonies n'est en réalité testé que par rapport à un seul sérum. Or, il se pourrait que ces colonies appartiennent justement au type pour lequel elles n'ont pas été testées.

4° EMPLOI D'UN SÉRUM POLYVALENT. — Nous avons donc pensé qu'il serait plus judicieux et plus rapide d'utiliser un sérum polyvalent agglutinant à la fois les *E. coli* 111:B4, 26:B6, 55:B5. Nous avons donc demandé à M. le Dr Le Minor de l'Institut Pasteur de préparer pour nous ce sérum. Nous l'utilisons actuellement et cette nouvelle technique nous permet un examen complet, même dans les cas où il n'est noté que quelques colonies de bacilles lactose +.

Toute colonie agglutinée par ce sérum est ensuite soumise aux sérums spécifiques (111, 26, 55) pour être identifiée.

RÉSUMÉ. — La recherche des *E. coli* des gastro-entérites infantiles, souvent délicate en raison de leur petit nombre dans certains prélèvements, se trouve grandement facilitée par l'emploi d'un milieu d'enrichissement et d'un sérum agglutinant polyvalent suivant la technique que nous avons énoncée ci-dessus.

LA CONSERVATION DU VIRUS DE LA PESTE BOVINE PAR LYOPHILISATION

par A. RAFYI, M. KAWEH et H. RAMIAR.

(*Institut d'Etat Razi, Hessarek-Karadj [Iran]*)

La difficulté de faire des passages, *in vivo*, sur bovins de race sensible au virus de la peste bovine est bien connue de ceux qui ont la responsabilité de préparer du vaccin antipestique.

Les méthodes employées par différents chercheurs pour conserver la vitalité des virus sont nombreuses, mais actuellement la plupart des auteurs utilisent la méthode de lyophilisation. Entre nos mains cette méthode donne de bons résultats, mais le comportement des diverses souches est assez variable.

Depuis la dernière épizootie de la peste bovine qui est apparue en 1949 au Nord-Est de l'Iran, venant d'un des pays voisins, l'Institut Razi avait la responsabilité de produire du vaccin inactivé, soit au laboratoire central d'Hessarek, soit dans une succursale locale.

Rappelons que la vaccination semi-obligatoire par le vaccin formolé de Curasson et Delpy nous a permis en cette circonstance d'empêcher l'extension de la maladie vers l'intérieur du pays, puis de juguler l'épizootie en moins d'un an.

Afin de parer à l'éventualité d'une nouvelle apparition de la peste, l'Institut devait rester en état de produire à tout moment du vaccin en quantité suffisante. Au début nous utilisions pour conserver nos souches des passages sur bovins d'une race très sensible (Mazandéran), mais cette méthode est très coûteuse, les passages devant être faits tous les huit jours.

Pour obvier à cet inconvénient, nous avons essayé de conserver la souche bovine virulente par la méthode de lyophilisation.

PRÉPARATION ET CONSERVATION DU VIRUS. — La rate des veaux, infectés expérimentalement de peste bovine, est broyée au Latapie et répartie à raison de 2 cm³ dans des flacons de 20 cm³. Le contenu de ces flacons est congelé puis desséché dans l'appareil Stokes, sous vide. Les flacons sont bouchés sous vide et le virus ainsi lyophilisé est conservé à la glacière à la température de +4° C.

Première expérience. — Le 3 janvier 1951, la rate du veau pestique 29-750 (trente-deuxième passage *in vivo*) est lyophilisée.

Le 27 janvier 1953, soit environ vingt-quatre mois après, nous avons inoculé avec ce virus le veau 31-964. L'animal, après avoir présenté des signes nets de peste classique, succombe le huitième jour.

Seconde expérience. — Le 29 janvier 1951, les veaux 31-90 et 31-91 ont été inoculés avec le virus lyophilisé depuis vingt-cinq mois. Ces deux veaux présentent des signes de peste classiques et succombent le neuvième jour.

Troisième expérience. — Le 24 août 1953, le veau 32-23 reçoit ce même virus lyophilisé depuis trente-deux mois. L'animal meurt le neuvième jour de peste aiguë. Le sang de ce veau a servi pour inoculer les veaux 32-24 et 32-25. Ces deux animaux présentent de l'hyperthermie vers le quatrième jour et succombent le neuvième jour et le dixième jour.

Quatrième expérience. — Le 21 janvier 1954, c'est-à-dire après trente-six mois de lyophilisation, le virus a servi pour inoculer les veaux 32-39 et 32-40. Le veau 32-39 n'a pas fait de réaction. Le veau 32-40 a présenté une hyperthermie de 40°5 accompagnée d'inappétence, et de signes respiratoires, et a guéri les jours suivants. Son sang a servi à inoculer le veau 32-31 qui a fait une peste typique et est mort le huitième jour.

Les veaux 32-39 et 32-40 éprouvés plus tard avec du virus normal n'ont présenté aucune réaction.

CONCLUSION. — Le virus de la peste bovine lyophilisé et conservé à la glacière à +4° C, selon notre technique, garde sa virulence jusqu'au trente-deuxième mois. Il commence à se raréfier à partir de cette date.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LÉPINE et V. SAUTTER. *Ces Annales*, 1941, **67**, 371.
- [2] R. E. HOFFSTADT et B. TRIPI. *J. inf. Dis.*, 1946, **78**, 183.
- [3] J. VERGE, P. GORET et Ch. MÉRIEUX. *Ces Annales*, 1946, **72**, 499.
- [4] L. P. DELPY. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1950, **33**, 227.
- [5] J. G. BROTHERSTON. *J. comp. Path.*, 1951, **61**, 263.
- [6] C. R. SCOTT et J. G. BROTHERSTON. *J. comp. Path.*, 1952, **62**, 108.

INTERACTION BACTÉRIOPHAGE-BACTÉRIE INTERPRÉTÉE PAR LA THÉORIE DU MOUVEMENT BROWNIEN

par M. H. BOISOT.

(Laboratoire de Physique de l'Ecole Polytechnique)

Une expérience récente effectuée à l'Institut Pasteur par A. Guélin et P. Lépine [1] révèle, ainsi que le montre la figure 1, la particularité suivante :

A concentration de bactériophages constante, la fixation des corpuscules, en fonction du nombre de bactéries, subit une importante diminution lorsque décroît le nombre de bactéries. Nous nous proposons, dans cette note, de fournir une hypothèse susceptible d'expliquer cette chute brusque de la fixation, correspondant à un certain nombre de bactéries.

Il est normal de supposer que les bactériophages sont soumis à un intense mouvement brownien, comparé à celui des bactéries. Si l'on assimile en première approximation les deux particules à des sphères, la formule d'Einstein s'écrit :

$$\bar{l}^2 = k T \frac{1}{3 \pi \eta r}$$

k : Constante de Boltzmann.

T : Température absolue.

η : Viscosité.

r : Rayon de la particule.

\bar{l}^2 : Moyenne quadratique du déplacement.

d'où l'on déduit que la moyenne quadratique du déplacement des bactériophages est environ vingt fois plus grande que celle des bactéries.

On sait qu'une particule soumise au mouvement brownien est attirée par une paroi, lorsque la distance qui l'en sépare est inférieure à une certaine valeur. On peut ainsi, compte tenu des dimensions respectives, et en assimilant la bactérie à une paroi, supposer une attraction à laquelle serait soumis le corpuscule bactériophage, lorsque celui-ci, au cours de sa trajectoire aléatoire, s'approche d'une bactérie d'une distance inférieure à une distance critique, que nous appellerons d_0 .

Imaginons une surface homothétique de la bactérie, qui, si elle était assimilée à une sphère, aurait pour diamètre celui de la bactérie, augmenté de $2 d_0$. Cette surface, que nous appellerons surface d'interaction, représente un volume à l'intérieur duquel tout corpuscule bactériophage subira une attraction, vers la bactérie, tandis que tout corpuscule situé à son extérieur échappera à cette force, mais par le jeu du mouvement brownien pourra la traverser et subir, de ce fait, l'attraction.

Lorsque la concentration en bactéries est faible, la distance moyenne

entre elles est supérieure à $2d_0 + a$, a désignant le diamètre d'une bactérie assimilée à une sphère. Au fur et à mesure que cette concentration augmente, la distance moyenne diminue jusqu'au moment où elle se trouve égale à $2d_0$.

Pour cette concentration, que nous appellerons concentration critique, la distance moyenne entre les bactéries est égale à :

$$2d_0 + a = \frac{1}{N^{\frac{1}{3}}}.$$

Si l'on continue à faire croître la concentration, la distance moyenne diminue encore, et se trouve inférieure à $2d_0$. Par conséquent, les

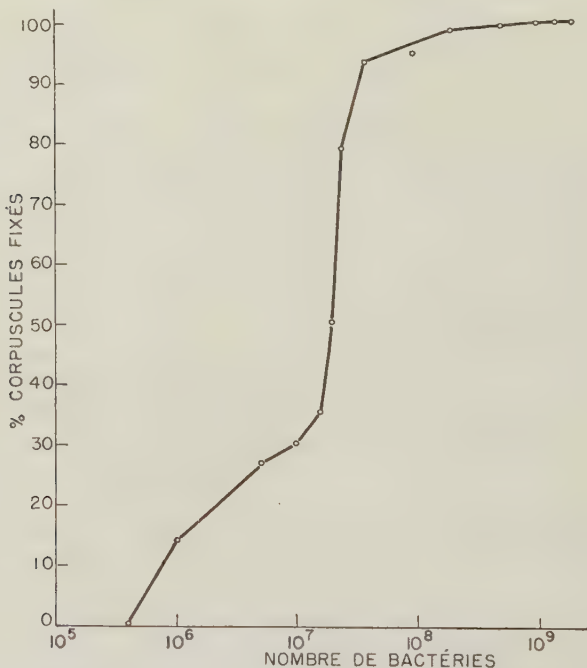


FIG. 1.

sphères d'interaction se recoupent statistiquement, et un corpuscule placé au hasard aura donc une plus grande probabilité de se situer à l'intérieur d'une sphère d'interaction en supposant l'homogénéité bactérienne réalisée. On conçoit alors aisément que la courbe de fixation obtenue par A. Guélin et P. Lépine présente, pour un domaine très étroit de la concentration bactérienne, une grande variation de la fixation.

Prenant alors le nombre de bactéries correspondant au point d'inflexion de la courbe, ce nombre N^0 permet de connaître d_0 , soit de l'ordre de $1/1\,000$ de centimètre ($= 10\ \mu$) en négligeant a devant d_0 ,

Il devrait être possible de confirmer ces vues en établissant une corrélation entre la fixation et les différents facteurs susceptibles de modifier le mouvement brownien, c'est ce que nous nous proposons d'entreprendre dans un avenir proche.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] A. GUELIN et P. LÉPINE. Ces *Annales*, 1955, **88**, 403.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Le virus humain dit « encéphalomyélitique de Brazzaville » est en réalité un virus poliomyélitique type 1. Les caractères biologiques anormaux de ce virus tropical, par A. PELLISSIER et E. TRINQUIER.

Etude d'une souche atténuée de virus du myxome (Uriarra III d'Australie), par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

Contribution à l'étude du complément. I. Inactivation spontanée dans les conditions de l'hémolyse. Action protectrice des ions calcium, par R. LAPORTE, L. HARDRÉ DE LOOZE et R. SILLARD.

Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque de l'œuf embryonné. IV. Action inhibitrice des substances acides, par B. FAUCONNIER.

LIVRES REÇUS

- T Guthe et R. R. Willcox. — *Les tréponématoses, problème mondial*, 84 p. Prix : Fr. fr. 160, Fr. s. 2 —, 3 s 6 d, \$ 0,50. (Réimpression du vol. 8, n^{os} 2-3, de la *Chronique de l'Organisation Mondiale de la Santé*.) [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e).]

Cette brochure expose les progrès réalisés depuis la deuxième guerre mondiale dans la lutte contre ce groupe de maladies. Les propriétés tréponémicides de la pénicilline et la mise au point de nouvelles techniques pour dépister les sujets justiciables d'un traitement ont eu des conséquences incalculables pour cet important secteur de la santé publique, notamment dans les régions où sévissent la syphilis, le pian et d'autres infections endémiques et où une action de grande envergure permet d'espérer qu'on parviendra un jour où l'autre à en avoir raison.

Les auteurs donnent un bref aperçu historique de l'épidémiologie des tréponématoses, décrivent la nature et l'ampleur du problème que ces maladies posent aujourd'hui et discutent des nouvelles méthodes dont on dispose pour les combattre. Suit une récapitulation des activités des gouvernements et des organisations internationales dans la lutte contre les tréponématoses au cours de ces dernières années. Une troisième section souligne la nécessité de déployer des efforts concertés pour maîtriser les maladies de ce groupe dans le cadre de mesures générales de santé publique. La brochure traite également des aspects économiques du problème et laisse entrevoir les gains économiques qui pourraient résulter de l'exécution de programmes judicieux de santé publique dans ce domaine.

H. T.

La sérologie et les techniques de laboratoire dans la lutte contre les tréponématoses. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 79, 1954, 52 p. Prix : Fr. fr. 160, Fr. s. 2 —, 3 s 6 d, \$ 0,50. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI°).]

Parmi les principales questions examinées par le Comité, on peut citer : la production, le contrôle et l'emploi des antigènes cardiolipides ; l'utilisation de sérums desséchés sous congélation dans la sérologie de la syphilis ; la stabilité des échantillons de sang et de sérum transmis par la poste ; enfin, les résultats obtenus jusqu'à présent par le test d'immobilisation de *Treponema pallidum* (TIT).

Des annexes au rapport exposent les résultats de différentes études de laboratoire, ainsi que ceux d'enquêtes portant sur les méthodes de diagnostic qui sont utilisées dans les différentes parties du monde.

H. T.

La vaccination antituberculeuse. Sixième rapport du Comité d'experts de la tuberculose. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 88, 1954, 11 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1 —, 1 s 9 d, \$ 0,25. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI°).]

Des preuves convaincantes autorisent aujourd'hui à penser que la vaccination permet de créer une résistance spécifique à la tuberculose. Il reste cependant, dans ce domaine, de nombreux problèmes à résoudre, qui ont fait l'objet des délibérations de la sixième session du Comité d'Experts de la Tuberculose de l'OMS, dont le rapport vient de paraître.

Ce rapport traite principalement de la vaccination par le BCG. Parmi les questions passées en revue concernant le vaccin lui-même, on peut mentionner : les différences relevées dans les propriétés allergènes des vaccins préparés par des laboratoires différents et dans l'intensité des réactions qu'ils provoquent, et les qualités de conservation des vaccins, notamment des vaccins desséchés sous congélation et des vaccins liquides. De nouvelles recherches sont nécessaires à cet égard.

Les différentes techniques d'administration du vaccin sont discutées, en particulier la vaccination par voie buccale au moyen de fortes doses

répétées de BCG (« vaccination concomitante »), ainsi que les méthodes permettant d'évaluer l'allergie produite et la protection conférée par la vaccination. Des indications sont données sur les épreuves tuberculiniques préalables à la vaccination, sur le choix des sujets à vacciner lors des campagnes de masse et sur la revaccination des sujets non allergiques.

Les autres questions abordées dans le rapport sont : la vaccination par le bacille murin et par les bacilles tués (anatuberculine) ; l'intégration de la vaccination par le BCG dans l'activité des services de santé publique ; l'action de l'OMS dans le domaine de la coordination des recherches scientifiques et la lutte antituberculeuse à l'échelle internationale ; le rôle de la vaccination par le BCG dans la prophylaxie de la lèpre.

H. T.

Comité d'experts du paludisme. Cinquième rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 80, 1954, 48 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1 —, 1 s 9 d, \$ 0,25. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e).]

Ce rapport traite d'abord du rôle des insecticides. Deux faits nouveaux sont particulièrement importants à cet égard : l'apparition chez les anophèles d'une résistance aux insecticides, et l'interruption des pulvérisations d'insecticides à effet rémanent, qui a été réalisée avec succès en Guyane Britannique, en Grèce et aux Etats-Unis d'Amérique. Sur le premier de ces points, le rapport souligne que le problème de la résistance des anophèles aux insecticides est certes à étudier, mais que la résistance rencontrée jusqu'ici ne constitue pas un obstacle sérieux à la lutte antipaludique. Quant au second fait, qui permet d'envisager la cessation des pulvérisations à partir du moment où la transmission du paludisme a été réduite dans une mesure suffisante, il exige que l'on mette au point des critères d'après lesquels on pourra déterminer à quel moment « l'élimination complète » de la maladie est réalisée, et que l'on prenne certaines précautions lorsque les pulvérisations ont été effectivement interrompues.

Dans un chapitre consacré à la chimiothérapie du paludisme, le rapport étudie deux nouveaux médicaments, la pyriméthamine et la primaquine. Il mentionne les avantages que peut présenter, dans certaines circonstances, l'emploi des nouveaux antipaludiques de synthèse ; une annexe expose l'état actuel des médicaments antipaludiques en usage.

Signalons, parmi les autres questions traitées : les acquisitions scientifiques récentes en paludologie et les possibilités d'extension de l'action antipaludique internationale. Cet aperçu montre que l'on est maintenant beaucoup plus près du but, qui est « l'élimination du paludisme en tant que problème de santé publique dans le monde ».

Statistiques sanitaires. Notes et rapports, Bull. Org. mond. Santé, 1954, 44, 314 p. Prix : Fr. s. 12, —, £ 1, \$ 3. [Dépositaire pour la France, Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e).]

Comité d'experts des soins infirmiers. Troisième rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 91, 32 p., Prix : Fr. fr. 80, 1954, Fr. s. 1, —, 1 s 9 d, \$ 0,25. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e)].

M. Vaucel, E. Roubaud et H. Galliard. — *Terminologie du paludisme. Rapport d'un Comité de Rédaction nommé par l'Organisation Mondiale de la Santé. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Monographies, n° 25, 1954, 96 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 6 —, 10 s, \$ 1,50. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e).]*

Pour répondre à la nécessité urgente d'une nomenclature uniforme des termes utilisés par les paludologues, la Commission du Paludisme de l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations avait élaboré un « Rapport sur la terminologie employée en paludologie », qui fut publié en 1940. Ce rapport, qui est actuellement épuisé, a récemment fait l'objet d'une révision approfondie par deux comités de rédaction (anglais et français) nommés par l'Organisation Mondiale de la Santé. Le rapport français vient de paraître dans la Série de Monographies de l'OMS.

Ce rapport, qui, d'une manière générale, suit le plan adopté dans le rapport de la Commission du Paludisme, est divisé en deux parties : la première est un commentaire des termes utilisés par les paludologues (à l'exclusion, cependant, des termes qui concernent les techniques de l'ingénieur et les appareils de pulvérisation, ainsi que des noms des médicaments antipaludiques) ; la seconde est constituée par un glossaire détaillé, qui sert en même temps d'index au commentaire. Celui-ci comprend trois chapitres consacrés respectivement aux parasites du paludisme et à l'infection qu'ils provoquent chez l'homme, à la mesure du paludisme dans la collectivité humaine, et au vecteur de l'infection, l'anophèle. Le glossaire donne, pour chaque terme, une définition succincte avec renvoi approprié au commentaire, ainsi que l'expression anglaise équivalente partout où cela s'est trouvé possible.

Les principaux aménagements introduits par rapport à la publication antérieure concernent : la terminologie relative aux formes du parasite chez l'hôte vertébré et à la reproduction exoérythrocytaire du *Plasmodium*, accompagnée de schémas qui en illustrent les différents types, et l'utilisation et l'action des médicaments antipaludiques.

H. T.

Rapport d'un groupe d'études. L'identification et la classification des mollusques vecteurs de la bilharziose (Afrique équatoriale et Afrique du Sud). Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 90, 1954, 24 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1, —, 1 s 9 d, \$ 0,25. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e)].

Substances thérapeutiques, prophylactiques et diagnostiques, Bull. Org. mond. Santé, 1954, 40, 171 p. Prix : Fr. s. 6, —, 10 s, \$ 1,50. [Dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e)].

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 88

ACHARD (M.-L.). — Voir SEIGNEURIN (R.).	
ALIX (D.). — Voir DESBORDES (J.).	
ANDRAL (L.). — Voir CHABAUD (A.-M.).	
ARBOUYS (S.), FINE (J.) et EXQUEM (A.). — Contribution à l'étude électrophorétique du sérum de cynocéphales	671
ARNOULT (H.). — Purification du vaccin antivaricelleux sec et glycérolisé par la streptomycine.	254
— Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur de Saigon de 1891 à 1954	435
ATANASIU (I.). — Voir ATANASIU (P.).	
ATANASIU (P.) et (I.). — Transmission du virus de la maladie de Newcastle et de la variole aviaire à la roussette	393
— BASSET (J.) et ATANASIU (I.). — Sur l'interférence, dans la maladie de Newcastle de l'embryon de poulet, entre le virus homologue pressé, chauffé, formolé et les liquides normaux	769
— Voir JELESIC (Z.).	
AUGAGNEUR (J.). — Voir VIAILLIER (J.).	
BARJAC (H. DE). — Voir POCHON (J.).	
BARME (M.) et CHABBERT (Y.). — Concentrations humorales obtenues avec la tétracycline <i>per os</i>	256
BARON (J.-B.). — Voir CABAU (N.).	
BASSET (J.). — Voir ATANASIU (P.).	
BERNARD (J.). — Voir GRABAR (P.).	
BIZZINI (B.). — Voir FISCHER (G.).	
— Voir RAYNAUD (M.).	
BLACHÈRE (H.). — Voir VILLECOURT (P.).	
BOISOT (H.). — Interaction bactériophage-bactérie interprétée par la théorie du mouvement brownien	795
BOISVERT (H.). — La culture des mycobactéries sur gélose nutritive. Son intérêt relatif pour différencier les bacilles tuberculeux et paratuberculeux	84
BOLLE (A.). — Comparaison biochimique d'une souche sensible (<i>Staphylococcus aureus</i> Londres) avec une souche résistante (Staph. « Leg ») aux antibiotiques	258

- BONIFAS (V.). — Voir GRASSET (E.).
- BOYER (F.). — Voir CHEDID (L.).
- BRÉCHOT (P.). — Voir GUIBERT (L.).
- BRIEUX (S.). — Voir HANNOUN (C.).
- BRISOU (J.). — Voir TULASNE (R.).
- BRUN (G.) et SIGOT (A.). — Etude de la sensibilité héréditaire au CO₂ chez la drosophile. II. Installation du virus σ dans la lignée germinale à la suite d'une inoculation . . . 488
- BRUN (J.), VIAILLIER (J.) et LAGER (S.). — Etude de 88 souches de bacilles tuberculeux isolées de 113 prélèvements de lésions tuberculeuses pleuropulmonaires . . . 518
- CABAU (N.), BARON (J.-B.), MONESTIER (F.) et GUILLON (S.). — Flore microbienne oculaire . . . 265
- CARR (L. G. K.) et MACHEBOËUF (M.). L'action de la pénicilline sur le métabolisme protidique dans les cellules proliférantes des bactéries. III. . . . 104
- CHABAUD (M. A.), SÉRIÉ (Ch.) et ANDRAL (L.). — Electrophorèse et diagnostic de la rage . . . 420
- CHABBERT (Y.) et VÉRON (M.). — Action des associations d'antibiotiques sur les staphylocoques polyrésistants. Synergie érythromycine-bacitracine . . . 656
- Voir BARME (M.).
- Voir SZTURM-RUBINSTEN (S.).
- Voir TERRIAL (G.).
- CHALLUT (F.). — Voir SOHIER (R.).
- CHALVIGNAC (M.-A.). — Voir POCHON (J.).
- CHAMBON (L.). — Résistance du b. de Whitmore acquise *in vitro* et *in vivo* à l'égard du chloramphénicol, de l'aureomycine et de la terramycine . . . 315
- Sensibilité *in vitro* du b. de Whitmore à la framycétine . . 466
- CHARDONNET (Y.). — Voir SOHIER (R.).
- CHAUSSINAND (R.), VIETIE (M.) et KRUG (O.). — Nouvelles observations sur l'action de l'INH dans l'infection murine à b. de Stefansky . . . 378
- CHEDID (L.) et BOYER (F.). — Etude comparative du pouvoir antitoxique de la cortisone et de la chlorpromazine. . . 336
- COUTEAU (M.). — Voir SEGRETAÏN (G.).
- COUTURE (J.), MAILLARD (M.-A.) et DUBOST (M.). — Passage dans le sang de la tétracycline . . . 472
- DANIEL (Ph.). — Voir DELAUNAY (A.).
- DELAUNAY (A.), DANIEL (Ph.), ROQUEFEUIL (C. DE) et HÉNON (M.). — Effets exercés par la patuline et des mélanges patuline-cystéine sur les propriétés physiologiques des cellules phagocytaires. . . . 699

DEOM (J.) et MORTELMANS (J.). — Sur la sensibilité <i>in vitro</i> de <i>Trichomonas gallinae</i> et <i>Tr. foetus</i> à la néomycine et à la viomycine.	521
DESBORDES (J.), FOURNIER (E.) et ALIX (D.). — Action des substances colorantes sur les mycobactéries. II. Colorants basiques (suite).	120
— III. Influence du lavage préalable avec différents solvants des lipides	240
— IV. Colorants acides ; influence du pH.	719
DESCHIEUS (R.). — Etude comparée des hyperéosinophilies en fonction de leur étiologie.	679
DESPUJOLS (B.-P.). — Pouvoir toxique sur la souris blanche d'extraits solubles fungiques et microbiens préparés suivant la technique de Mauté	268
DEVIGNAT (R.). — Technique simple d'observation microscopique directe de la croissance de cellules bactériennes sur gélose.	117
DIGEON (M.), MANGALO (R.), TURPIN (A.) et RAYNAUD (M.). — Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique. IV. Propriétés immunologiques des différentes fractions obtenues.	170
DROUHET (E.). — Action de la nystatine (fungicidine) <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur <i>Candida albicans</i> et autres champignons levuriformes	298
DUBOST (M.). — Voir COUTURE (J.).	
DUCHAUFOR (Ph.) et POCHON (J.). — Note sur la biologie des humus forestiers	261
DURAND (B.). — Voir MOUSTARDIER (G.).	
EYQUEM (A.). — Voir ARBOUYS (S.).	
— Voir JOCHEM (E.).	
FABIANI (G.) et ORFILA (J.). — Apparition de l'immunité contre <i>Plasmodium berghei</i> chez les souris soumises au régime lacté ou à la sulfamidothérapie	108
FAGUET (M.). — Activité antimicrobienne de certains composés chimiques étudiée au microbiophotomètre.	713
FAUCONNIER (B.). — Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque de l'œuf embryonné. III. Action favorisante du carbonate de magnésium	96
FINE (J.). — Voir ARBOUYS (S.).	
FISCHER (G.), BIZZINI (B.), RAYNAUD (M.) et PRÉVOT (A.-R.). — Etudes sur les bactéries ligninolytiques. II.	618
— Voir RAYNAUD (M.).	
FOURNIER (J.). — Voir DESBORDES (J.).	
GALLUT (J.) et JUDE (A.). — Contribution à l'étude de la virulence et du pouvoir toxigène du vibron cholérique. II. Influence de la température d'incubation sur le pouvoir toxigène <i>in vitro</i> de <i>V. cholerae</i> (Ogawa).	282

- Voir JUDE (A.).
- GEOFFROY (M.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- GERBEAUX (C.). — Milieu d'enrichissement et technique d'isolement des *E. coli* des gastro-entérites infantiles. 790
- GÛNESTE (J.). — Voir PEILLARD (M.).
- GIRARD (G.) et CHEVALIER (A.). — Classification sérologique de 56 souches de *Pasteurella pseudotuberculosis*, dont 52 isolées en France. 227
- GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). — Etude critique de diverses méthodes utilisées pour apprécier l'activité d'un vaccin anti-typhoïdique. 601
- GRABAR (P.). — Réactions de divers sérums normaux avec des substances macromoléculaires naturelles ou synthétiques. 11
- SELIGMANN (M.) et BERNARD (J.). — Méthodes de préparation d'extraits leucocytaires et de sérums anti-leucocytaires susceptibles d'être utilisés pour des études immuno-chimiques. 548
- GRASSET (E.) et BONIFAS (V.). — Modalités de transformation en formes L *in vivo* de *Proteus vulgaris* et d'autres *Enterobacteriaceae* sous l'action de la pénicilline. 651
- et SCHWARTZ (D. E.). — Fractionnement par électrophorèse sur papier du venin de *Vipera russellii*. Propriétés et dosages des facteurs coagulant et anticoagulant de ce venin. 271
- GRELET (N.). — Nutrition azotée et sporulation de *B. cereus* var. *mycoides*. 60
- GUELIN (A.). — Isolement et étude des bactériophages actifs sur les anaérobies. Leur rôle dans l'évolution du phlegmon expérimental. 289
- Bactériophages typhiques à grandes et à petites plages des eaux polluées et leur photosensibilité. 576
- et LÉPINE (P.). — Multiplication de phages et de bactéries en solution de L-tryptophane et en fonction du nombre de bactéries au départ. 403
- GUIBERT (L.) et BRÉCHOT (P.). — La lyophilisation des levures. . 750
- GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et GEOFFROY (M.). — Notes sur quelques propriétés des toxines engendrées par différents types de *Cl. botulinum*. 44
- — — Action de divers sérums sur des toxines botuliques. 153
- GUILLON (S.). — Voir CABAU (N.).
- HAMELIN (A.). — Voir VAISMAN (A.).
- HAMON (Y.). — Etude d'une colicine élaborée par une culture de *S. paratyphi* B. 193

- HANNOUN (C.) et BRIEUX (S.). — Infection à virus et métabolisme cellulaire. I. Absorption et libération d'acides aminés par les cellules chorioallantoïques en survie. 397
- HEAGAN (B.). — Voir ROSENTHAL (S. R.).
- HÉNON (M.). — Voir DELAUNAY (A.).
- JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). — Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*E. coli*. III. Effet du rayonnement ultraviolet sur la recombinaison génétique. 724
- JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et LE PRIOL (A.). — Récidive, après quatre ans et demi, d'une conjonctivite humaine à virus de Newcastle. 111
- — et VIRAT (B.). — Etude sur la transmission expérimentale de la myxomatose au lièvre. 1
- — — Stabilité relative du pouvoir pathogène du virus du myxome infectieux. 234
- — — Considérations sur la durée et le mécanisme de l'immunité engendrée par le virus du fibrome de Shope contre le myxome de Sanarelli. 381
- Voir VIRAT (B.).
- JACQUELINE (F.). — Voir JOCHEM (E.).
- JELESIC (Z.) et ATANASIU (P.). — Sur les paralysies des souris immunisées dans le test de protection des différents vaccins antirabiques. 786
- JOCHEM (E.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). — Contribution à l'étude sérologique de la réaction d'agglutination des globules rouges sensibilisés par un immunsérum. . . . 625
- JUDE (A.) et GALLUT (J.). — Contribution à l'étude de la virulence et du pouvoir toxigène du vibrion cholérique. I. Influence de la température d'incubation sur la virulence expérimentale de *Vibrio cholerae* (Ogawa). 145
- Voir GALLUT (J.).
- KAWEH (M.). — Voir RAFYI (A.).
- KRÉGUER (A.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- KRUG (O.). — Voir CHAUSSINAND (R.).
- LABROSSE (S.). — Voir VARGUES (R.).
- LAGER (S.). — Voir BRUN (J.).
- LECOCQ (E.). — Voir LINZ (R.).
- LE MINOR (L.). — Variantes biochimiques de *S. miami* et *S. sendai*.
Etude de l'antigène a. 76
- LE MINOR (M^{me} S.). — Voir GRABAR (M^{me} J.).
- LE PEINTRE (M.). — Voir OLIVIER (H.-R.).
- LÉPINE (P.). — Voir GUELIN (A.).
- LE PRIOL (A.). — Voir JACOTOT (H.).
- LEVADITI (J.). — Voir PRÉVOT (A. R.).
- Voir STAUB (A. M.).

- LINZ (R.) et LECOCQ (E.). — La multiplication de staphylocoques et de colibacilles résistants en présence de streptomycine. . . 178
- LINZENMEIER (G.). — Voir SEELIGER (H.).
- L'OZACH (M.) et VIALAT (Ch.). — Toxoplasmose du chien en France. . 526
- MAHAFFEY (L. W.). — Voir RENOUX (G.).
- MAILLARD (M. A.). — Voir COUTURE (J.).
- MANGALO (R.). — Voir DIGEON (M.).
- Voir RAYNAUD (M.).
- MONESTIER (F.). — Voir CABAU (N.).
- MORTELMANS (J.). — Voir DEOM (J.).
- MOUREAU (M.). — Recherches biochimiques sur les tréponèmes anaérobies. I. *T. comandoni*, *T. phagedenis*, *T. refringens* et *T. ambigua*. 231
- MOUSTARDIER (G.) et DURAND (B.). — Etude bactériologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des selles de prématurés et de nourrissons 515
- NAZIMOFF (O.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- NOUFFLARD (H.). — Etudes sur la virulence des b. tuberculeux résistants à l'INH. 325
- OLIVIER (H.-R.) et LE PEINTRE (M.). — Solubilisation par voie biochimique de l'arsenic lié au fer dans les sols. 668
- ORFILA (J.). — Voir FABIANI (G.).
- ORTA (B.). — Voir PILLET (J.).
- PEILLARD (M.), SOHIER (R.) et GINESTE (J.). — Recherches sur les titres d'anticorps (fixation du complément) significatifs en France d'une infection récente due au virus de la grippe, des oreillons et du groupe ornithose-psittacose. 446
- PIÉCHAUD-BOURBON (D.). — Voir THIBAUT (P.).
- PILLET (J.), ROUYER (M.) et ORTA (B.). — Recherches sur la nature chimique des agglutinogènes staphylococciques 662
- PLUS (N.). — Etude de la sensibilité héréditaire au CO₂ chez la drosophile. I. Multiplication du virus σ et passage à la descendance après inoculation ou transmission héréditaire. . . 347
- POCHON (J.), BARJAC (H. DE) et CHALVIGNAC (M.-A.). — Recherches sur la microflore des terreaux naturels et artificiels. . . 783
- Voir DUCHAUFOR (Ph.).
- PRÉVOT (A. R.), LEVADITI (J.), TARDIEUX (P.) et NAZIMOFF (O.). — Caractères histopathologiques de la réticulose expérimentale du lapin provoquée par les corynébactéries anaérobies. 537
- et RAYNAUD (M.). — Au sujet de la distinction entre *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus acidophilus* 229
- SILLIOC (R.) et PROUTÉ (J.). — Etude d'un foyer de botulisme bovin dû à *Cl. botulinum* C 513
- Voir FISCHER (G.).
- Voir RAYNAUD (M.).

- Voir TARDIEUX (P.).
- PROUTÉ (J.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- RAFYI (A.), KAWEH (M.) et RAMIAR (H.). — La conservation du virus de la peste bovine par lyophilisation. 793
- RAMIAR (H.). — Voir RAFYI (A.).
- RAYNAUD (M.), BIZZINI (B.), FISCHER (G.) et PRÉVOT (A.-R.). — Etudes sur les bactéries ligninolytiques. I. 454
- TURPIN (A.), MANGALO (R.) et BIZZINI (B.). — Croissance et toxinogénèse. II. 24
- Voir DIGEON (M.).
- Voir FISCHER (G.).
- Voir PRÉVOT (A.-R.).
- RENOUX (G.) et MAHAFFEY (L. W.). — Sur l'existence probable de nouveaux antigènes des *Brucella*, avec un nouveau schéma proposé pour représenter la répartition des antigènes. . . 528
- ROQUEFEUIL (C. DE). — Voir DELAUNAY (A.).
- ROSENTHAL (S. R.) et HEAGAN (B.). — Studies on the life cycle of the tubercle bacilli (BCG). 479
- Inhibitory phenomena of filtrates of young cultures of tubercle bacilli (BCG). Relationship to bacteriophage, lysogenic and colicinogenic organisms. 591
- ROUYER (M.). — Voir PILLET (J.).
- ROZANSKY (R.). — Voir TARDIEUX (P.).
- SCHWARTZ (D. E.). — Voir GRASSET (E.).
- SEELIGER (H.) et LINZENMEIER (G.). — Etude sérologique des souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France. . . 127
- SEGRETAIN (G.) et COUTEAU (M.). — Différenciation entre *Torulopsis (Cryptococcus) neoformans* et corps amyloïdes du système nerveux central 128
- SEIGNEURIN (R.) et ACHARD (M.-L.). — Croissance microbienne et sensibilité aux antibiotiques. 660
- SELIGMANN (M.). — Voir GRABAR (P.).
- SÉRIÉ (Ch.). — Voir CHABAUD (A.-M.).
- SIGOT (A.). — Voir BRUN (G.).
- SILLIOC (R.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- SOHIER (R.), CHALLUT (F.) et CHARNONNET (Y.). — Immunisation du cobaye par voie nasale contre le virus des oreillons et essai de mise au point d'une méthode de diagnostic rapide de l'infection ourlienne chez l'homme 113
- Voir PEILLARD (M.).
- STAUB (A.-M.), VIRAT (B.) et LEVADITI (J.). — Pouvoir létal de certaines souches acapsulogènes de *B. anthracis* 244
- SZTURM-RUBINSTEN (S.), CHABBERT (Y.) et THIBAUT (P.). — *Haemophilus bronchisepticus* et *Alcaligenes faecalis*. II. Sensibilité aux antibiotiques 250

- Voir THIBAUT (P.).
- TARDIEUX (P.), PRÉVOT (A.-R.) et ROZANSKY (R.). — Contribution à l'étude des sphérophoroses : pouvoir pathogène de *Spherophorus gulosus*. 124
- Voir PRÉVOT (A.-R.).
- TERRIAL (G.) et CHABBERT (Y.). — Evolution vers la résistance aux antibiotiques des germes isolés à Paris chez les malades de ville de 1949 à 1954. 777
- THIBAUT (P.), SZTURM-RUBINSTEN (S.) et PIÉCHAUD-BOURBON (D.). — *Haemophilus bronchisepticus* et *Alcaligenes faecalis*. I. De quelques caractères différentiels. 246
- Voir SZTURM-RUBINSTEN (S.).
- TINELLI (R.). — Etude de la biochimie de la sporulation chez *B. megaterium*. I. Composition des spores obtenues par carence des différents substrats carbonés. 212
- II. Modifications biochimiques et échanges gazeux accompagnant la sporulation provoquée par carence de glucose 364
- III. Etude du comportement d'une souche de *B. megaterium* asporogène mise dans les conditions de sporulation. 642
- TOUMANOFF (C.). — Etude comparative de la souche toxigène de *B. cereus* var. *sotto*, agent pathogène de la flacherie des vers à soie au Japon 384
- et VAGO (C.). — Sur la virulence vis-à-vis du ver à soie de quelques *cereus* entomophytes en tant que test de comparaison. 388
- et VIRAT (B.). — Action des antibiotiques et des sulfamides *in vitro* sur les bactéries aérobies sporogènes. 563
- TULASNE (R.) et BRISOU (J.). — Les pleuropneumoniales. Taxonomie des « Pleuropneumonia-like-organisms » et des formes L. 237
- TURPIN (A.). — Voir DIGEON (M.).
- Voir RAYNAUD (M.).
- VAGO (C.). — Voir TOUMANOFF (C.).
- VAISMAN (A.) et HAMELIN (A.). — Etude de l'immunité des rejetons dans les infections récurrentielles chez le cobaye, le rat et la souris 665
- VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (H.).
- Voir VIRAT (B.).
- VARGUES (R.) et LABROSSE (S.). — Recherches sur le pouvoir anti-complémentaire de l'euglobuline I₁ de Sandor. 205
- VERMEIL (C.). — *Gerbillus histipes* Lataste, nouveau rongeur de laboratoire 137
- VÉRON (M.). — Voir CHABERT (Y.).
- VIALAT (Ch.). — Voir L'OZACH (M.).

- VIALIER (J.) et AUGAGNEUR (J.). — Traitement par les ammoniums quaternaires des produits pathologiques pour l'isolement du bacille tuberculeux. 391
— Voir BRUN (I.).
- VIETTE (M.). — Voir CHAUSSINAND (R.).
- VILLECOURT (P.) et BLACHÈRE (H.). — Oxydation du lactose en acide lactobionique par des bactéries pathogènes ou saprophytes (*B. anitratum*) 523
- VIRAT (B.), VALLÉE (A.) et JACOTOT (H.). — Au sujet des différents types de salmonelles aviaires. 133
— Voir JACOTOT (H.).
— Voir STAUB (A.-M.).
— Voir TOUMANOFF (C.).
- WOLLMAN (E. L.). — Voir JACOB (F.).

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 88

<i>Alcaligenes faecalis</i> . — Sensibilité aux antibiotiques.	250
— Voir aussi <i>Haemophilus bronchisepticus</i> .	
<i>Anaérobies</i> . — Voir <i>Tréponèmes</i> .	
<i>Antibiotiques</i> . — Action de la nystatine (fungicide) sur les champignons levuriformes.	298
— Action des — <i>in vitro</i> sur les bactéries aérobies sporogènes.	563
— Action des associations d'— sur les staphylocoques polyrésis- tants. Synergie érythromycine-bacitracine.	656
— Croissance microbienne et sensibilité aux —	660
— Activité antimicrobienne de certains composés chimiques.	713
— Evolution vers la résistance aux — des germes isolés à Paris chez les malades de ville de 1949 à 1954	777
— Voir aussi <i>B. tuberculeux</i> , <i>B. de Whitmore</i> , <i>Staphylocoques</i> , <i>Trichomonas</i> et aux différents antibiotiques.	
<i>Arsenic</i> . — Solubilisation par voie biochimique de l'— lié au fer dans les sols.	668
<i>Bacille tuberculeux</i> . — Intérêt relatif de la culture des myco- bactéries sur gélose pour différencier — — et paratuberculeux.	84
— Virulence des — — résistants à l'INH.	325
— Traitement par les ammoniums quaternaires des produits pathologiques pour l'isolement du — —	391
— Cycle vital du — —	479
— Etude de 88 souches de — — isolés de lésions tuberculeuses pleuropulmonaires.	518
— Phénomènes d'inhibition.	591
— Voir aussi <i>Bactériophage</i> .	
<i>Bacille de Whitmore</i> . — Résistance du — — acquise <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> à l'égard du chloramphénicol, de l'auréomycine et de la terramycine.	315
— Sensibilité du — — à la framycétine.	466
<i>Bacillus anthracis</i> . — Pouvoir létal de certaines souches acapsu- logènes de — —	244
<i>Bacillus megaterium</i> . — Voir <i>Sporulation</i> .	
<i>Bactéries ligninolytiques</i> . — Etudes sur les — —. I et II.	454 et 618
<i>Bactériophages</i> . — — typhiques à grandes et à petites plages ; photosensibilité.	576

— Effet du rayonnement U. V. sur la recombinaison génétique.	724
— Interaction bactériophage-bactérie interprétée par la théorie du mouvement brownien.	795
<i>Biochimie des bactéries.</i> — Oxydation du lactose en acide lactobionique par des bactéries pathogènes ou saprophytes. . . .	523
<i>Botulisme.</i> — Foyer de — bovin dû à <i>Cl. botulinum</i> G. . . .	513
— Voir aussi <i>Sérum, Toxine.</i>	
<i>Brucella.</i> — Existence probable de nouveaux antigènes des —.	
Schéma de leur répartition	528
<i>Champignons.</i> — Différenciation entre <i>Torulopsis neoformans</i> et corps amyloïdes du système nerveux central.	128
— Pouvoir toxique pour la souris d'extraits solubles fungiques et microbiens préparés suivant la technique de Mauté. . . .	268
— Voir aussi <i>Antibiotiques.</i>	
<i>Chlorpromazine.</i> — Voir <i>Cortisone.</i>	
<i>Colibacilles.</i> — Voir <i>Staphylocoques.</i>	
<i>Colicine.</i> — Etude d'une — élaborée par une culture de <i>S. paratyphi</i> B	193
<i>Corps amyloïdes.</i> — Voir <i>Champignons.</i>	
<i>Cortisone.</i> — Pouvoir antitoxique de la — et de la chlorpromazine.	336
<i>Corynébactéries.</i> — Voir <i>Réticulose.</i>	
<i>Drosophile.</i> — Sensibilité héréditaire au CO ₂ chez la —. Multiplication du virus σ et passage à la descendance après inoculation ou transmission héréditaire.	347
— Installation du virus σ dans la lignée germinale après inoculation.	488
<i>Electrophorèse.</i> — Fractionnement par — sur papier du venin de <i>Vipera russellii</i>	271
— du sérum de cynocéphale.	671
— Voir aussi <i>Rage.</i>	
<i>Euglobuline.</i> — Pouvoir anticomplémentaire de l'— I ₁ de Sandor.	205
<i>Fibrome.</i> — Mécanisme de l'immunité engendrée par le — de Shope contre le myxome de Sanarelli.	381
<i>Fièvre récurrente.</i> — Immunité des rejetons chez le cobaye, le rat et la souris.	665
<i>Formes L.</i> — Modalités de transformation en — — <i>in vivo</i> de <i>Proteus vulgaris</i> et d'autres <i>Enterobacteriaceae</i> sous l'action de la pénicilline.	651
— Voir aussi <i>Pleuropneumoniales.</i>	
<i>Gastro-entérites.</i> — Techniques d'isolement des <i>E. coli</i> des — infantiles	790
<i>Grippe.</i> — Action favorisante du carbonate de magnésium sur le développement du virus grippal dans l'œuf embryonné. . .	96
— Recherche des anticorps	446

<i>Haemophilus bronchisepticus</i> . — Caractères différentiels de — — et <i>Alcaligenes faecalis</i>	246
— Sensibilité aux antibiotiques	250
<i>Hémagglutination</i> . — Agglutination des globules rouges sensi- bilisés par un immunosérum	625
<i>Humus</i> . — Biologie des — forestiers.	261
<i>Hyperéosinophilies</i> . — Etude comparée des — en fonction de leur étiologie	679
<i>Immunochimie</i> . — Préparation d'extraits leucocytaires et de sérum anti-leucocytaires.	548
<i>INH</i> . — Action de l'— dans l'infection murine à bacille de Stefansky	378
— Voir aussi <i>B. tuberculeux</i> .	
<i>Lèpre</i> . — Voir <i>INH</i> .	
<i>Levures</i> . — La lyophilisation des —	750
<i>Listeria</i> . — Etude sérologique des souches de — <i>monocytogenes</i> isolées en France.	127
<i>Métabolisme</i> . — Action de la pénicilline sur le — protidique des bactéries proliférantes.	104
<i>Microscope</i> . — Technique d'observation microscopique directe de la croissance de cellules bactériennes.	117
<i>Mycobactéries</i> . — Action des colorants basiques sur les —. Influence du pH et du lavage préalable avec différents solvants des lipides.	120 et 240
— Action des colorants acides sur les —. Influence du pH.	719
<i>Myxomatose</i> . — Transmission expérimentale de la — au lièvre.	1
— Stabilité relative du pouvoir pathogène du myxome infectieux.	234
— Voir aussi <i>Fibrome</i> .	
<i>Newcastle</i> . — Récidive après quatre ans et demi d'une conjoncti- vite humaine à virus de —	111
— Transmission du virus de la maladie de — à la roussette.	393
— Interférence chez l'embryon de poulet entre le virus pressé, chauffé, formolé et les liquides normaux.	769
<i>Œil</i> . — Flore microbienne oculaire.	265
<i>Oreillons</i> . — Immunisation du cobaye et méthode de diagnostic rapide chez l'homme	113
— Recherche des anticorps.	446
<i>Ornithose-psittacose</i> . — Recherche des anticorps.	446
<i>Paludisme</i> . — Immunité contre <i>Plasmodium berghei</i> chez les souris soumises au régime lacté ou à la sulfamidothérapie.	108
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> . — Classification sérologique de 56 souches de — —	227
<i>Pénicilline</i> . — Voir <i>Formes L</i> , <i>Métabolisme</i> .	
<i>Peste bovine</i> . — Conservation du virus de la — — par lyophili- sation.	793

<i>Phagocytes</i> . — Effets exercés par la patuline et des mélanges patuline-cystéine sur les —	699
<i>Pleuropneumoniales</i> . — Les —. Taxonomie des « pleuropneumonia-like-organisms » et des formes L.	237
<i>Pleuropneumonia-like-organisms</i> . — Voir <i>Pleuropneumoniales</i> .	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . — Etude bactériologique de — — isolés de selles de prématurés et de nourrissons.	515
<i>Rage</i> . — Electrophorèse et diagnostic de la —.	420
— Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur de Saigon, de 1891 à 1954	435
— Paralysies des souris immunisées dans le test de protection des vaccins antirabiques	786
<i>Réticulose</i> . — Histopathologie de la — expérimentale mortelle du lapin provoquée par les corynébactéries anaérobies.	537
<i>Rhumatisme</i> . — Voir <i>Hémagglutination</i> .	
<i>Rongeur</i> . — <i>Gerbillus hirtipes</i> Lataste, nouveau — de laboratoire.	137
<i>Salmonelles</i> . — Variantes biochimiques de <i>S. miami</i> et <i>S. sendai</i> ; étude de l'antigène a.	76
— Les différents types de — aviaires.	133
— Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique. Propriétés immunologiques des différentes fractions obtenues.	171
<i>Sérum</i> . — Réactions de divers — normaux avec des substances macromoléculaires naturelles ou synthétiques.	11
— Action de divers — sur des toxines botuliques.	153
<i>Sol</i> . — Microflore des terreaux naturels et artificiels.	783
<i>Sphérophoroses</i> . — Pouvoir pathogène de <i>Spherophorus gulosus</i>	124
<i>Spirochètes</i> . — Voir <i>Fièvre récurrente</i> .	
<i>Sporulation</i> . — Nutrition azotée et — de <i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	60
— Biochimie de la — chez <i>B. megaterium</i> . I. Composition des spores obtenues par carence des différents substrats carbonés.	212
II. Modifications biochimiques et échanges gazeux accompagnant la — provoquée par carence de glucose.	364
III. Comportement d'une souche asporogène mise dans les conditions de —.	642
<i>Staphylocoques</i> . — La multiplication de — et de colibacilles résistants en présence de streptomycine.	178
— Comparaison biochimique d'une souche sensible avec une souche résistante aux antibiotiques.	258
— Nature chimique des agglutinogènes staphylococciques.	662
— Voir aussi <i>Antibiotiques</i> .	
<i>Streptomycine</i> . — Voir <i>Colibacilles</i> , <i>Staphylocoques</i> , <i>Variole</i> .	
<i>Sulfamides</i> . — Action des — <i>in vitro</i> sur les bactéries aérobies sporogènes.	563
— Voir <i>Paludisme</i> .	

<i>Taxonomie.</i> — Distinction entre <i>Bifidibacterium bifidum</i> et <i>Lactobacillus acidophilus</i>	229
— Voir aussi <i>Pleuropneumoniales</i> .	
<i>Tétracycline.</i> — Concentrations humorales obtenues avec la — per os.	256
— Passage dans le sang de la —.	472
<i>Toxine.</i> — Croissance et toxinogénèse.	24
— Propriétés des — engendrées par différents types de <i>Cl. botulinum</i>	44
— Voir aussi <i>Chlorpromazine</i> , <i>Cortisone</i> .	
<i>Toxoplasmose.</i> — — du chien en France.. . . .	526
<i>Tréponèmes.</i> — Biochimie des — anaérobies, <i>T. comandoni</i> , <i>T. phagedenis</i> , <i>T. refringens</i> et <i>T. ambigua</i>	231
<i>Trichomonas.</i> — Sensibilité <i>in vitro</i> de — <i>gallinae</i> et de — <i>fœtus</i> à la néomycine et à la viomycine	521
<i>Vaccins.</i> — Etude critique des diverses méthodes d'évaluation de l'activité d'un — antityphoïdique	601
<i>Variole.</i> — Purification du vaccin antivariolique sec et glycéринé par la streptomycine.	254
— Transmission du virus de la — aviaire à la roussette.	393
<i>Venin.</i> — Voir <i>Electrophorèse</i> .	
<i>Ver à soie</i> — Etude comparative de la souche toxigène de <i>B. cereus</i> var. <i>sotto</i>	384
— Virulence pour le — — de quelques <i>cereus</i> entomophytes en tant que test de comparaison.	388
<i>Vibrion cholérique.</i> — Influence de la température d'incubation sur la virulence et le pouvoir toxigène du — —	145 et 282
<i>Virus.</i> — Infection à — et métabolisme cellulaire.	397
— Voir aussi <i>Drosophila</i> et aux différents virus.	

TABLE DES OUVRAGES PRÉSENTÉS OU REÇUS

(TOME 88)

<i>Actualités pharmacologiques publiées sous la direction de RENÉ</i>	
HAZARD	533
<i>Atti della Società Italiana Scienze Veterinarie. Vol. VII.</i>	142
<i>Autotrophic microorganisms.</i>	142
BAUMGAERTEL (T.) — <i>Klinische Darmbakteriologie.</i>	535
BOLLE (F.). — <i>Mensch und Mikrobe</i>	400
CAROTHERS (J.-C.). — <i>Psychologie normale et pathologique de l'Africain</i>	140
<i>Ciba Foundation Symposium. Peripheral circulation in man.</i>	144
<i>Ciba Foundation Symposium. The kidney.</i>	270
COLLIER (H. O. J.). — <i>Chemotherapy of infections</i>	142
<i>Comité d'Experts de l'Administration de la Santé publique.</i>	
Rapport O. M. S.	140
<i>Comité d'Experts de l'assainissement. Rapport O. M. S.</i>	140
<i>Comité d'Experts des maladies rhumatismales. Rapport O. M. S.</i>	140
<i>Comité d'Experts du paludisme. Rapport O. M. S.</i>	799
<i>Experimental diabetes and its relation to the clinical disease.</i>	144
FISCHER (R. B.). — <i>Protein metabolism.</i>	142
FLECHTNER (H. J.). — <i>Gesundheit durch Krankheit</i>	141
GIRARD (G.). — <i>La peste.</i>	651
GUNTHER (O.). — <i>Neue Antigentabelle der Salmonellagruppe.</i>	678
GUTHE (T.) et WILLCOX (R. R.). — <i>Les tréponématoses, problème mondial.</i>	797
HAUDUROY (P.). — <i>Problèmes actuels de virologie.</i>	534
<i>Histochemische Methoden.</i>	143
HOUBEN-WEYL. — <i>Methoden der organischen Chemie. Vol. VII,</i>	
I ^{re} partie. Les aldéhydes.	143
<i>Identification et classification des mollusques vecteurs de la bilharziose. Rapport O. M. S.</i>	800
JACOB (F.). — <i>Les bactéries lysogènes et la notion de provirus.</i>	376
KLONE (W.). — <i>Laboratoriumsdiagnose menschlicher Virus- und Rickettsien-Infektionen.</i>	143
<i>Lectures on scientific basis of medicine.</i>	534
MANN (T.). — <i>The biochemistry of semen</i>	535

MAUPIN (B.). — <i>Les plaquettes sanguines de l'homme.</i>	676
MOURANT (A. E.). — <i>The distribution of the human blood groups.</i>	674
NABARRO (J. D. N.). — <i>Biochemical investigations in diagnosis and treatment.</i>	536
NÉVOT (A.). — <i>Le diagnostic bactériologique en pratique médicale.</i>	270
PARISH (H. J.). — <i>Antisera, toxoids, vaccines and tuberculins in prophylaxis and treatment.</i>	677
POCHON (J.). — <i>Manuel technique d'analyse microbiologique du sol.</i>	377
<i>Première Conférence internationale des Commission nationales de statistiques démographiques et sanitaires. Rapport O. M. S.</i>	140
RACE (R. R.) et SANGER (R.). — <i>Blood groups in man.</i>	675
<i>Report of the Medical Research Council for the year 1952-1953</i>	402
ROMANOFF (A. L.) et ROMANOFF (A. J.). — <i>The avian egg</i>	678
SCANGA (F.). — <i>La cellula batterica.</i>	533
SCHMIDT (H.). — <i>Fortschritte der Serologie.</i>	677
<i>Sérologie et techniques de laboratoire dans la lutte contre les tréponématoses. Rapport O. M. S.</i>	798
<i>Sous-alimentation et malnutrition chez les mères, les nourrissons et les enfants. Rapport O. M. S.</i>	140
<i>Statistiques sanitaires. Notes et Rapports O. M. S.</i>	799
<i>Substances thérapeutiques, prophylactiques et diagnostiques. Bull. O. M. S.</i>	800
<i>Techniques de laboratoire. Tome I : Chimie physique, Chimie biologique. Tome II : Chimie clinique.</i>	141
<i>The discovery of unicellular life. Excerpts from communications by Antoni van Leeuwenhoek to the Royal Society of London.</i>	141
<i>Transfusion sanguine et actualités hématologiques. 1^{er} Congrès National des Transfusions sanguines de France et des pays de langue française. Alger, avril 1953.</i>	675
<i>Vaccination antituberculeuse. Rapport O. M. S.</i>	798
VANNOTTI (A.). — <i>Porphyrins. Their biological and chemical importance.</i>	676
VAUCEL (M.), ROUBAUD (E.) et G LLIARD (H.). — <i>Terminologie du paludisme.</i>	800
WAKSMAN (S. A.). — <i>Perspectives and horizons in microbiology.</i>	677
WILLMER (E. N.). — <i>Tissue culture.</i>	535

Le Gérant : G. MASSON.